
Kinetische Untersuchungen zum Zusammenhang von Sequenz, Struktur und Funktion der Hammerhead Ribozyme

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von
Dipl. Biol. Anne Kalweit
aus Mittweida

1. Referent: Dr. Christian Hammann

2. Referent: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Tag der Einreichung: 18. Dezember 2012

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Februar 2013

Darmstadt 2013

D17

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Seehafer, C, Kalweit, A, Steger, G, Gräf, S, and Hammann, C, (2011). From alpaca to zebrafish: hammerhead ribozymes wherever you look. *RNA* 17, 21-26.

Kalweit A, Przybilski R, Seehafer C, de la Peña M, Hammann C, (2012). Characterization of hammerhead ribozyme reactions. *Methods in molecular biology* 848, 5-20.

Darmstadt, den 18. Dezember 2012.

.....

(Anne Kalweit)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Zusammenfassung	7
2. Einleitung	10
2.1 Die Rolle der RNA im zentralen Dogma der Molekularbiologie	10
2.2 Strukturelle Besonderheiten der Ribonukleinsäure	12
2.3 Katalytische Aktivität der RNA	13
2.4 Hammerhead Ribozyme	15
2.5 Datenbanksuchen nach genomisch codierten Hammerhead Ribozymen	19
2.5.1 RNAhit	20
2.6 Der Modellorganismus <i>Dictyostelium discoideum</i>	22
3. Zielstellung	24
4. Material und Methoden	25
4.1 Material	25
4.1.1 Geräte	25
4.1.2 Verbrauchsmaterialien	26
4.1.3 Kits und Enzyme	27
4.1.4 Chemikalien	28
4.1.5 Antibiotika	30
4.1.6 Medien	30
4.1.7 Puffer und Lösungen	32
4.1.8 Nukleotide	35
4.1.9 Oligonukleotide	36
4.1.10 Vektoren	43
4.1.11 Organismen	43
4.1.12 Größenstandards	44
4.1.13 Software und Online-Programme	44
4.2 Zellbiologische Methoden	44
4.2.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	44
4.2.2 Herstellung transformationskompetenter Zellen (Hanahan, 1983)	45
4.2.3 Transformation der kompetenten Zellen	45
4.2.4 Blau-Weiß Selektion	46

4.2.5	Axenische Kultivierung von <i>Dictyostelium discoideum</i>	46
4.2.6	Herstellung von <i>Dictyostelium discoideum</i> Sporen.....	47
4.2.7	Transformation von <i>Dictyostelium discoideum</i> mittels Elektroporation.....	47
4.3	Molekularbiologische Methoden.....	47
4.3.1	Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren.....	47
4.3.2	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren.....	48
4.3.3	Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten.....	48
4.3.4	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAA- Gelelektrophorese).....	48
4.3.5	Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....	49
4.3.6	Isolierung und Reinigung von radioaktiv markierter RNA aus PAA-Gelen.....	49
4.3.7	Plasmidminipräparation (nach Birnboim und Doily, 1979).....	50
4.3.8	Plasmidmaxipräparation (Birnboim, 1983).....	50
4.3.9	Isolierung genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
4.3.10	Isolierung genomischer DNA aus <i>Xenopus tropicalis</i>	51
4.3.11	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Xenopus tropicalis</i>	51
4.3.12	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Dictyostelium discoideum</i> (Chomczynski and Sacchi, 1987).....	52
4.3.13	Radioaktive Markierung der Größenstandards.....	52
4.3.14	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit PNK.....	53
4.3.15	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	54
4.3.16	Kolonie-PCR.....	55
4.3.17	Rekursive PCR.....	56
4.3.18	Restriktionsverdau von DNA.....	58
4.3.19	Ligation von DNA-Fragmenten.....	58
4.3.20	<i>In vitro</i> Transkription.....	59
4.3.21	Kinetische Analyse der Spaltungsreaktion der HHRz	60
4.3.22	Analyse der Ligationsreaktion der HHRz.....	61
4.3.23	Primer Extension Assay.....	61
4.3.24	S1 Nuklease Protektionassay.....	62
4.3.25	DNA-Sequenzierung.....	63

4.4	Biochemische Methoden.....	64
4.4.1	<i>In vivo</i> Analysen der HHRz mittels ONPG Assay.....	64
5.	Ergebnisse	65
5.1	Identifizierung von aktiven Typ III Hammerhead Ribozymen.....	65
5.1.1	Experimentelle Analyse ausgewählter Treffer.....	65
5.1.2	Anpassung der Filterschritte.....	71
5.2	Identifizierung und Spaltungsanalyse der HHRz in ihrer genomischen Umgebung.....	72
5.2.1	Identifizierung der <i>Xenopus tropicalis</i> HHRz in ihrer genomischen Umgebung.....	72
5.2.2	Funktionalität der HHRz in ihrer genomischen Umgebung.....	74
5.3	Expressionsanalyse der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7 und Xetr8.....	78
5.4	Analyse der Spaltungsaktivität verschiedener Typ III HHRz Mutanten.....	79
5.4.1	Herstellung der verschiedenen Typ III HHRz Mutanten.....	80
5.4.2	<i>In vitro</i> Spaltungskinetiken der verschiedenen TypIII HHRz Mutanten.....	81
5.4.3	Ligationsstudien der HHRz G17 Mutanten.....	87
5.4.4	<i>In vivo</i> Analyse der Typ III HHRz Mutanten mittels dem β -Gal Reportersystems.....	88
5.4.5	Expressionsanalyse der β -Gal mRNA mittels Primer Extention Assay.....	91
6.	Diskussion.....	94
6.1	Experimentelle Validierung der Filterschritte.....	94
6.2	Identifizierung der <i>Xenopus tropicalis</i> HHRz Motive auf genomischer Ebene.....	97
6.3	Funktionalität der HHRz Motive in ihrer natürlichen Umgebungssequenz.....	98
6.4	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Spaltungsanalysen verschiedener Typ III HHRz Mutanten.....	101
6.5	Herkunft und Funktion der HHRz	104
7.	Literaturverzeichnis.....	107
8.	Anhang.....	116
	Danksagung	
	Ehrenwörtliche Erklärung	
	Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
as	Antisense
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
α	alpha
bidest H ₂ O	zweimal destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
β	beta
ca	circa
C	Cytosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytidintriphosphat
°C	Grad Celsius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Elektroporation
FL	<i>full length</i>
for	<i>forward</i>
G	Guanin
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
γ	gamma
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HHRz	Hammerhead Ribozym
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
mA	Milliampere
Mb	Megabasen
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>

mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NP40	Nonident [®] P40
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
P	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Primer Extension
PEG	Polyethylenglycol
pmol	Pikomol
PNK	Polynukleotidkinase
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RbCl ₂	Rubidiumchlorid
rev	<i>revers</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukelosidtriphosphat
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
u	Unit
UE	Untereinheit
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierter Bereich (<i>untranslated region</i>)
UV-H ₂ O	mit ultravioletten Licht behandeltes bidest. Wasser
ü.N.	über Nacht
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
v/w	Volumen/Gewicht

WT	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
μ F	Mikrofarad
μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikromolar

1. Zusammenfassung

Das Hammerhead Ribozym (HHRz) ist die kleinste bekannte katalytische RNA und katalysiert die Spaltung und Ligation des eigenen Phosphordiesterückgrats durch eine Umesterungsreaktion (S_N2 -Reaktion; Lilley, 2003). Die Minimalstruktur der HHRz besteht aus einer hochkonservierten katalytischen Core-Region und drei flankierenden Helices mit variablen Längen. Natürlich vorkommende HHRz werden anhand der Helix die nicht durch einen Hairpin Loop geschlossen ist, in drei verschiedene Typen eingeteilt. Die katalytische Aktivität der HHRz ist abhängig von verschiedenen Faktoren, zum einen vom Vorhandensein von divalenten Metall-Ionen und zum anderen von Tertiärinteraktionen zwischen den Loops 1 und 2 bzw. den Helices I und II. Basierend auf der Tatsache, dass Interaktionen zwischen den Loops 1 und 2 bzw. zwischen den Helices I und II für eine effiziente Faltung und schnelle Spaltungskinetiken verantwortlich sind, könnten für die HHRz kombinierte Sequenz- und Strukturbeschreibungen erstellt werden. Mit diesen ist es möglich gezielt Datenbanken nach genomisch codierten HHRz zu durchsuchen. So konnten in Zusammenarbeit mit Carsten Seehafer und dem von ihm entwickelten Programm RNAhit, welches auf Sequenz- und Strukturmotiven sowie auf thermodynamischen Faltungsparametern basiert, eine Vielzahl von Typ III HHRz in allen Bereichen des Lebens identifiziert werden. Jedoch kann durch diese Suchen nicht zwischen HHRz unterschieden werden, die nur den Musterbeschreibungen entsprechen und solchen die katalytisch funktionell sind. Somit sollte anhand von 19 ausgewählten primären HHRz Treffern, aus *Xenopus tropicalis*, *Arabidopsis thaliana* und *Arabidopsis lyrata*, die katalytische Aktivität in *in vitro* Spaltungsexperimenten untersucht und anhand der Ergebnisse die Filtereinstellungen bestätigt oder optimiert werden. Der ΔG -Wert ist ein Maß für die thermodynamische Stabilität einer Molekülstruktur und somit, neben der freien Faltung in ein HHRz, eines der wichtigsten Filterkriterien bei der Suche nach katalytisch aktiven HHRz. Alle ausgewählten primären Treffer zeigten einen $\Delta G^{0}_{37^{\circ}\text{C}, \text{free}}$ -Wert von ≤ -10 kcal/mol und unterschiedliche $\Delta\Delta G^0$ -Werten. In *in vitro* Spaltungsanalysen in Anwesenheit von 2 mM MgCl_2 konnten für acht der insgesamt 19 analysierten HHRz in Abhängigkeit von der Zeit eine autokatalytische Aktivität beobachtet werden. Dabei zeigten die HHRz Motive Xetr1, 2, 4, 5, 7 und 8 aus *X. tropicalis*, Arly3 aus *A. lyrata* und das als Positivkontrolle eingesetzte Ara1 Motiv die Spaltung des *full length* Transkripts in die beiden Spaltprodukte. In einem anschließenden Vergleich der Sequenzen, Sekundärstrukturen und thermodynamischen Parameter der spaltenden und nicht spaltenden HHRz, konnten die Filtereinstellungen zur Identifizierung katalytisch aktiver HHRz wie folgt angepasst werden:

Der $\Delta\Delta G^0$ -Wert sollte ≤ 0 sein, die freie Faltung sollte die typische HHRz Sekundärstruktur ausbilden und die Helix-Regionen I und II sollten keine Wobble-Basenpaarung (U-G oder G-U) aufweisen. Nach Anwendung des angepassten Analyseprogramms konnten für *A. thaliana* aus den anfänglich 988 Treffern lediglich die beiden schon bekannten katalytisch aktiven HHRz, Ara1 und Ara2, gefunden werden. Im Falle von *A. lyrata* konnte unter den 1490 gefundenen HHRz Motiven ein Treffer, mit einer Sequenzhomologie von 99% zu Ara1 aus *A. thaliana*, identifiziert werden und für *X. tropicalis* konnten aus der Großzahl der primären Treffer (4976) noch 6 katalytisch aktive HHRz herausgefiltert werden. Somit stellt sich heraus, dass nicht jedes den Musterbeschreibungen entsprechende HHRz Motiv katalytische Eigenschaften besitzt und dass es einer spezifischen Filtereinstellung zur Identifizierung von aktiven HHRz bedarf.

Des Weiteren konnten die 6 neu identifizierten HHRz aus *X. tropicalis* auf genomischer DNA amplifiziert werden, wobei nicht für alle Motive eine 100%ige Übereinstimmung zu den in der Datenbank hinterlegten Sequenzen festgestellt werden konnte. Lediglich die beiden hochkonservierten Motive Xetr7 und 8 zeigten eine 100%ige Homologie und wurden in Abhängigkeit ihrer genomischen Umgebungssequenz *in vitro* auf ihre katalytische Aktivität geprüft. Dabei konnte entgegen aller Erwartungen festgestellt werden, dass in der Umgebungssequenz von Xetr7 und 8 zusätzliche katalytisch aktive HHRz vorhanden sind, die mit den zuvor beschriebenen Analyseprogramm RNAhit nicht gefunden werden konnten. Weiterhin konnte mittels einem S1 Nuklease Protektionassay die Expression dieser hochkonservierten Region in verschiedenen Geweben von *X. tropicalis* gezeigt werden.

Die Ausbildung der katalytisch aktiven Form eines HHRz beruht auf tertiären Interaktionen zwischen den Loops1 und 2 und es spielen die hochkonservierten Nukleotide der Core-Region eine entscheidende Rolle. So konnte in diesem Zusammenhang bereits in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass diese tertiären Interaktionen die Aktivität natürlich vorkommender HHRz erhöhen und die Abhängigkeit der Magnesiumkonzentrationen auf einen in der Zelle vorhandenen physiologischen Wert senken. In diesem Zusammenhang konnten, neben den *in vitro* Spaltungsanalysen erstmals auch ein von Stephan Wiegand in *Dictyostelium discoideum* etabliertes β -Gal Reportersystem zur *in vivo* Analyse der katalytischen Aktivität der HHRz Motive unter physiologischen Bedingungen genutzt werden. Somit wurden PolyC-Loop Mutanten von vier unterschiedlichen Typ III HHRz Wildtypsequenzen (Xetr2 und 5, PLMVd, Ara1) *in vivo* und *in vitro* analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Ausbildung von tertiären Interaktionen zwischen den Loops1 und 2 über nicht Watson-Crick Basenpaare in den verschiedenen Organismen nicht denselben Einfluss

auf die katalytische Aktivität haben. So wiesen alle PolyC-Loop1 Mutanten eine ähnliche Aktivität wie der WT auf, wogegen die PolyC-Loop2 Mutanten eine deutlich verringerte Aktivität zeigten. Dies deutet darauf hin, dass die Substitution der Loop2 Nukleotide zu Cytosinen die Interaktion mit Loop1 verringert, wodurch den WT Nukleotiden in Loop2 eine für die katalytische Aktivität entscheidende Rolle zukommt. Lediglich bei den PLMVd C-Loop Mutanten konnte im Spaltungsverhalten kein nennenswerter Unterschied im Vergleich zum WT festgestellt werden. Somit sprechen die Ergebnisse deutlich für die Ausbildung von individuellen tertiären Interaktionen zwischen den Loop1 und Loop2 Sequenzen bzw. den Helices I und II, wodurch die aktive Konformation des HHRz stabilisiert wird.

Des Weiteren zeigt die Core-Region der HHRz eine hochkonservierte Sequenz bestehend aus 11 Nukleotiden, dabei ist die Spaltstelle so definiert, dass an Position 17 ein A, C oder U aber kein G vorhanden sein sollte. Im Falle eines G an dieser Position sollte es zu einer Basenpaarung mit dem gegenüberliegenden C an Position 3 kommen, somit sollte die Spaltstelle blockiert werden und keine aktive HHRz Konformation ausgebildet werden (Ruffner et al., 1990). Unter dieser Voraussetzung sollte die G17 Mutante zunächst als interner Größenstandard für das WT Motiv in der *in vitro* Transkription dienen. Jedoch zeigten diese *in vitro* Experimente eine katalytische Aktivität der G17 Mutanten, welche anschließend auch unter physiologischen Bedingungen in *in vitro* und *in vivo* Experimenten bestätigt werden konnten. Auffällig war, dass sie deutlich geringere Spaltungseffizienzen als die WT Sequenzen hatten, was mit der Ausbildung des G17C3 Basenpaares zusammenhängen könnte und dessen Einfluss auf die Bildung des für die katalytische Aktivität erforderlichen C3G8 Basenpaares. Anhand der erhaltenen Ergebnisse für die Funktionalität der G17 Mutante konnten diese Varianten auch im Genom von *X. tropicalis*, *A. thaliana* und *S. mansoni* identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass diese Motivvariationen der HHRz ähnlich häufig in den verschiedensten Organismen zu finden waren wie die C17 Motive und mit ihrer verringerten katalytischen Aktivität eine besondere Rolle in der Zelle spielen könnten.

Mittels der Datenbanksuchen und experimentellen Analysen konnte ein Einblick über die Variabilität und Verbreitung der HHRz erhalten werden, wodurch jedoch die Suche nach der biologischen Funktion der HHRz in der Zelle deutlich erschwert wird.

2. Einleitung

2.1 Die Rolle der RNA im zentralen Dogma der Molekularbiologie

Der Brite Francis Crick publizierte 1958 die Hypothese über den gerichteten Informationsfluss zwischen DNA, RNA und Proteinen als Zentrales Dogma der Molekularbiologie (s. Abb. 2.1).

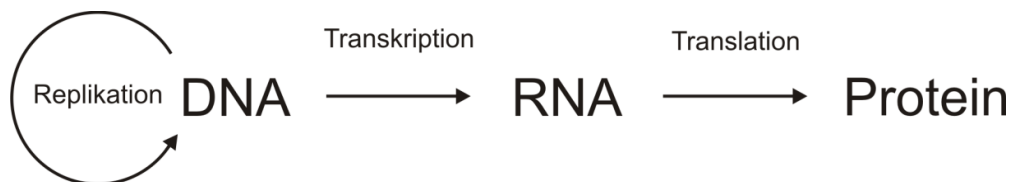


Abb. 2.1: Zentrales Dogma der Molekularbiologie

Der von F. Crick 1958 beschriebene sequentielle Informationsfluss von DNA über RNA hin zum Protein. Dabei existieren verschiedene Übertragungsarten: von DNA zu DNA mittels Replikation; von DNA zu RNA durch Transkription und von RNA zum Protein über Translation.

Bereits 1898 konnte erstmals durch den Mediziner Johann Friedrich Miescher die Nukleinsäure in einem Zellextrakt entdeckt und 1919 durch Phoebus Levene die Bestandteile der DNA (Base, Zucker und Phosphatrest) identifiziert werden (Levene, 1919). Ausgangspunkt der von F. Crick postulierten Hypothese, war die Entdeckung der DNA als Träger der genetischen Information durch die Forschergruppe um Oswald Avery (Avery, 1944). Somit rückte die Nukleinsäure als Schlüssel-molekül des Lebens immer mehr in den Fokus der Forschung. Ihr struktureller Aufbau, als Doppelhelix, konnte durch den US-Amerikaner James Watson und Francis Crick 1953 aufgeklärt werden (Watson und Crick, 1953). Zusammen mit Maurice Wilkins wurden sie dafür 1962 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Nukleinsäuren sind Polynukleotide, bestehend aus heterozyklischen Basen, einer Pentose und einer Phosphatgruppe, wobei zwischen DNA und RNA anhand der Pentose unterschieden wird. DNA enthält als Kohlenhydratbaustein 2-Desoxyribose und RNA Ribose. Zusammen mit der Phosphatgruppe bilden sie das strukturelle Gerüst der Nukleinsäuren, an denen die Purinbasen, Adenin (A) und Guanin (G) und die Pyrimidinbasen, Thymin (T), Cytosin (C) und im Falle der RNA Uracil (U) und Cytosin (C), als Informationsträger befestigt sind. Die genetische Information ist in der Reihenfolge der Basen im Strang codiert. Durch das Anlagern von zwei komplementären Einzelsträngen kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen (Watson-Crick Basenpaare) und zur Entstehung der typischen Sekundärstruktur der DNA. Adenin und Thymin bilden eine Watson-Crick Basenpaarung über zwei Wasserstoffbrücken aus und Guanin und Cytosin verfügen über drei Wasserstoffbrücken. Neben der DNA, als Speichermolekül der genetischen Information, stehen die Proteine als funktionelle Einheit im

zentralen Dogma im Vordergrund. Sie können durch die Vielfalt an chemisch funktionellen Gruppen die verschiedensten strukturellen und enzymatischen Aufgaben in der Zelle übernehmen. Hingegen wurde der RNA, in Form der *messenger* RNA (mRNA), eher eine passive Rolle zugeschrieben und dient lediglich der Übertragung der genetischen Information von der DNA auf die Proteine. Jedoch konnte schon im Jahre 1970 durch Temin und Baltimore die Allgemeingültigkeit des zentralen Dogmas mit der Entdeckung der reversen Transkriptase in Retroviren widerlegt werden (Temin und Mizutani, 1970; Baltimore, 1970). Somit ist es auch ein Informationsfluss von RNA zu DNA möglich. In den folgenden Jahren konnten neben den Funktionen als mRNA, tRNA und rRNA, weitere zentrale Funktionen der RNA aufgeklärt und ihr eine entscheidende Rolle in den verschiedensten zellulären Prozessen zugeordnet werden. Sie ist u.a. beteiligt an:

- Regulation von Genen bei der Replikation, Transkription und Translation als mRNA, tRNA und rRNA (Crick, 1970).
- Der Regulation der Genexpression in Form von Riboswitches (Mandal et al., 2003; Mandal und Breaker, 2004), micro RNA (Bartel, 2004), siRNA (Meister et al., 2004; Mello und Conte, 2004), antisense RNA (Wagner und Simons, 1994; Sleutels et al., 2002).
- Der Prozessierung von verschiedenen RNAs durch z.B. snRNA (*small nuclear* RNA) und snoRNAs (*small nucleolar* RNA) (Bachellerie et al., 2002).
- Stabilität der Chromosomen durch siRNA (Hall et al., 2003; Grewal und Rice, 2004) und Telomerase RNA (Legassie und Jarsfer, 2006).
- Der Katalyse von RNAs durch Selbstprozessierung und enzymatische Aktivität. Auf diese besondere Funktion der RNA wird in einem späteren Kapitel noch ausführlicher eingegangen.

Somit stellt die RNA den „Allrounder“ unter den Biomolekülen dar, indem sie neben der Eigenschaft als Vermittler zwischen DNA und Protein, auch über die Funktion der DNA als Speicher der genetischen Information und ähnlich wie Proteine über katalytische Funktionen verfügt. Dabei können gleiche RNA Arten in verschiedenen Organismen unterschiedliche Funktionen übernehmen. All diese Funktionen beruhen auf der strukturellen Vielseitigkeit der RNA und erlauben die Annahme, dass das Leben basierend auf der RNA begonnen haben könnte. In diesen Zusammenhang wurde der Begriff der RNA-Welt von Walter Gilbert geprägt (Gilbert, 1986). Die Grundlage dieser RNA-Welt-Hypothese ist auf das Miller-Urey Experiment zurückzuführen. Dabei wurde gezeigt, dass unter Bedingungen, wie vor drei Milliarden Jahren, organische Verbindungen aus anorganischen Substanzen entstehen können

(Miller, 1953; Miller und Urey, 1959). Somit können aus möglichen Bestandteilen der Ursuppe in wenigen Reaktionsschritten Ribonukleotide gebildet werden (Powner et al., 2009) und aus diesen wiederum können biologisch aktive Moleküle entstehen, wie in einem Computermodell gezeigt werden konnte (Obermayer et al., 2011).

2.2 Strukturelle Besonderheiten der Ribonukleinsäure

Der Aufbau der RNA ähnelt dem der DNA, wobei die Ribose der RNA an der 2'-Position im Pentose-Ring eine Hydroxylgruppe statt eines Wasserstoffatoms besitzt. Dies führt zu einer geringeren Stabilität der RNA, da durch Hydrolyse die Bindung zum nächsten Nukleotid gelöst werden kann und die RNA in ihre einzelnen Nukleotide zerfällt. In der Regel ist die RNA einzelsträngig, kann aber sehr stabile und komplexe intramolekulare Basenpaarungen ausbilden, was die Vorhersage von Sekundär- und Tertiärstrukturen relativ schwierig macht. Die Sekundärstruktur der RNA wird von helikalen Bereichen dominiert, die von ungepaarten Loop Bereichen unterbrochen sind und der RNA somit charakteristische Strukturen und Funktionen verleiht (Abb.2.2). Die wohl berühmteste zweidimensionale RNA Struktur, ist die Kleeblattstruktur der tRNA (Lake, 1967).

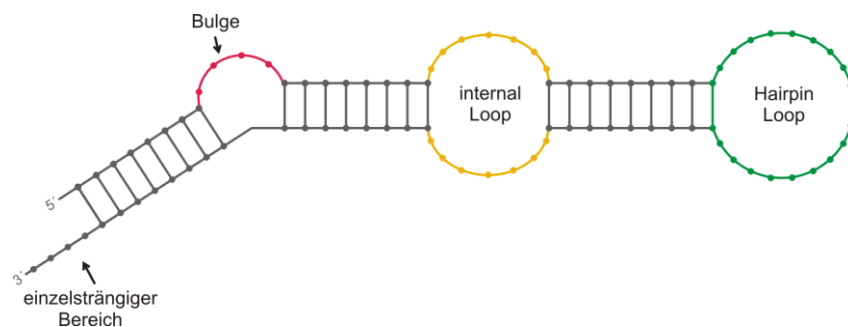


Abb. 2.2: Mögliche Sekundärstrukturen der RNA

Die Faltung einer einzelsträngigen RNA kann durch komplementäre Basenpaarung bestimmter Bereiche die Ausbildung verschiedener Sekundärstrukturen bewirken. Der Bulge (rot) besteht aus ungepaarten Basen auf einer Seite des Doppelstranges, wodurch die Struktur gebogen wird. Der internal Loop (gelb) verbindet helikale Bereiche und besteht aus ungepaarten Basen. Ein Hairpin Loop (grün) zeichnet sich durch ein Basenpaar mit anschließendem Loop Bereich aus (Zuker und Stiegler, 1981).

Die Tertiärstruktur beruht auf der vorhandenen Sekundärstruktur, der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und Stapelwechselwirkungen. Dabei sind die intramolekularen Interaktionen der RNA häufig auf die aus der DNA bekannten Watson-Crick Basenpaare

(W-C) zurückzuführen. Zusätzlich gibt es aber auch ungewöhnliche Basenpaarung, wie das G-U Wobble-Basenpaar (Crick, 1966). Zudem beobachtete Hoogsteen 1963 bei kristallographischen Analysen, dass Basen nicht nur über die W/C Seite Wasserstoffbrücken ausbilden können (Hoogsteen, 1963). Es ist auch eine Interaktion über die so genannte Hoogsteen Seite bei Purinen (Hoogsteen *edge*), die C-H Seite bei Pyrimidinen (C-H *edge*) und der Ribose zugewandten Seite (*Sugar edge*) möglich. Die Basenpaarung kann generell zwischen allen möglichen Seiten erfolgen und in *cis* oder *trans* Orientierung bezüglich der N-glykosidischen Bindung sein. Daraus ergeben sich, die von Leontis und Westhof klassifizierten, zwölf möglichen Basenpaarungen zwischen RNA Nukleotiden (s. Abb. 2.3; Leontis und Westhof, 2001; Leontis et al., 2002).

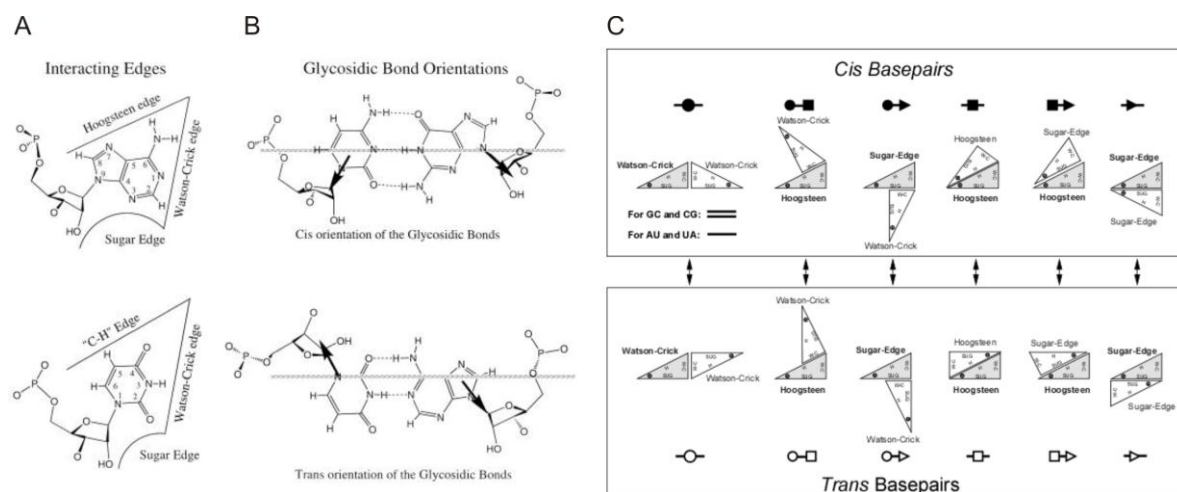


Abb. 2.3: Interaktionsmöglichkeiten von RNA Nukleotiden

A Über Wasserstoffbrückenbindungen interagierende Seiten eines Purinnukleotids (oben) und eines Pyrimidinnukleotids (unten). **B** *Cis* (oben) und *trans* (unten) Orientierung der N-glykosidischen Bindung über die Watson-Crick Seite (Abb. aus Leontis und Westhof, 2001). **C** Die nach der Klassifizierung von Leontis und Westhof möglichen zwölf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen interagierenden Nukleotiden. Die Interaktionen sind durch verschiedene Symbole festgelegt: Die Wasserstoffbrückenbindung über die W/C *edge* ist durch einen Kreis gekennzeichnet, die *Sugar edge* durch ein Dreieck und die Hoogsteen *edge* durch ein Quadrat. Die Symbole der *cis* interagierenden Basen sind schwarz gefüllt und die der *trans* interagierenden ungefüllt (Abb. aus Leontis, et al., 2002).

Aufgrund dieser Flexibilität sind Struktur- und Faltungsvorhersagen von RNA Molekülen sehr kompliziert, ermöglichen ihr aber ein breites Funktionsspektrum.

2.3 Katalytische Aktivität der RNA

Die Vielzahl der in der Zelle ablaufenden chemischen Reaktionen benötigen effiziente Katalysatoren. Lange Zeit ging man davon aus, dass ausschließlich Proteine dazu in der Lage sind Reaktionen zu katalysieren. Jedoch konnten Tom Cech und Sidney Altman vor rund 30 Jahren feststellen, dass auch RNA-Moleküle diese Funktionen übernehmen können. So wurde der Begriff Ribozym, bestehend aus **Ribonukleinsäure** und **Enzym**, geprägt (Küger et al.,

1982). Czech untersuchte in seinen Experimenten am Ciliaten *Tetrahymena thermophila* die Prozessierung von ribosomaler RNA und beobachtete dabei, dass sich katalytische RNAs, die sogenannten Gruppe-I-Introns, selbst aus der Prä-rRNA schneiden und diese zu der Sequenz der rRNA verknüpfen (Cech et al., 1981). Auch Altmann untersuchte anhand des Enzyms RNaseP aus *E. coli*, die Prozessierung von RNA Transkripten. Dieses Enzym entfernt nicht benötigte Nukleotide am 5'-Ende der tRNA Vorläufer (Guerrier-Takada et al., 1983). RNaseP besteht aus einer RNA und einer Proteinuntereinheit, liegt also als Ribonukleoprotein (RNP) in der Zelle vor. Dabei ist aber in *E. coli* lediglich die RNA katalytisch aktiv und das Protein sorgt dafür, dass die RNA die richtige Struktur für die Katalyse einnimmt – ähnlich wie bei der Peptidyltransferase-Aktivität in den Ribosomen (Nissen et al., 2000). Im Allgemeinen wird bei auf RNA katalytisch wirksamen Ribozymen die Spaltung und Ligation der Sequenz durch eine Umesterungsreaktion katalysiert. Dabei handelt es sich um einen nukleophilen Angriff zweiter Ordnung (S_N2 -Reaktion), wobei die deprotonierte 2'-Hydroxylgruppe des Nukleotids die 3,5'-Phosphodiester-Bindung angreift. Dadurch entstehen zwei Spaltprodukte: Das 3'-Produkt mit dem 2,3'-zyklischen Phosphat und das 5'-Produkt mit der 5'-Hydroxylgruppe (s. Abb. 2.4). Diese Reaktion ist reversibel und kann zu einem Gleichgewicht zwischen Spaltung und Ligation führen (Lilley, 2003).

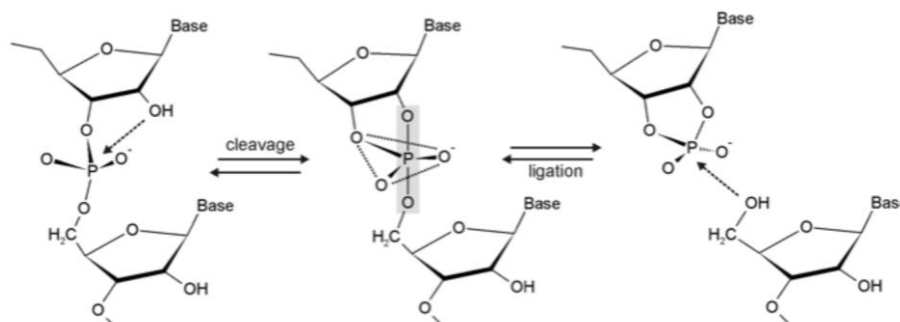


Abb. 2.4: S_N2 -Reaktionsmechanismus katalytisch aktiver RNAs

Die deprotonierte 2'-Hydroxylgruppe des Nukleotids greift die benachbarte 3,5'-Phosphodiester-Bindung an. Dadurch bildet sich eine trigonal bipyramidale Zwischenstufe und resultiert anschließend in einer 5'-Hydroxylgruppe am 3'-Spaltprodukt und einem 2,3'-zyklischen Phosphodiester am 5'-Spaltprodukt. Diese wiederum sind Ausgangspunkte für eine Ligationsreaktion (Abb. aus Przybilski und Hammann, 2006).

Es lassen sich verschiedene Gruppen von Ribozymen unterscheiden, z.B. die bereits erwähnten selbstspaltenden Introns, die RNaseP, das Ribosom und die kleinen katalytischen RNAs. Aufgrund ihrer geringen Größe von 50-150 nt (Lilley, 2005), sind diese besonders für die Analysen von RNA-Struktur-Funktionen geeignet sind (Birikh et al., 1997). Die kleinen katalytischen RNAs lassen sich in vier Klassen selbstspaltender Ribozyme einteilen: zunächst die Hairpin Ribozyme, welche in Satelliten RNAs von Pflanzenviren gefunden wurden und an der Prozessierung von multimeren Transkripten in Monomere beteiligt sind (Feldstein et al.,

1989; Hampel und Tritz, 1989). Die Sekundärstruktur besteht aus mindestens zwei Helix-internal Loop-Helix Bereichen, wobei in der aktiven Konformation die beiden Loops miteinander interagieren (DeRose, 2002). Die zweite Klasse stellt das Hepatitis Delta Virus (HDV) Ribozym aus dem namensgebenden Satellitenvirus dar, das bei dessen Replikation eine entscheidende Rolle spielt, indem es die im *rolling circle* Mechanismus entstehenden Multimere in Monomere spaltet (Lai, 1995). Es besteht aus vier helikalen Segmenten, die über verschiedene Pseudoknoten miteinander verbunden sind (Ferré-D'Amaré et al., 1998). Die dritte Klasse bildet das Varkud satellite (VS) Ribozym, welches in Mitochondrien eines *Neurospora* Stammes gefunden wurden und dort ebenfalls die multimere RNA (VS RNA) in Monomere spaltet (Saville und Collins, 1990). Die Sekundärstruktur besteht aus sechs helikalen Domänen die über Loop Bereiche miteinander verbunden sind (Beattie et al., 1995). Die vierte Klasse sind die Hammerhead Ribozyme, die im folgenden Abschnitt näher vorgestellt werden sollen.

2.4 Hammerhead Ribozyme

Das Hammerhead Ribozym (HHRz) ist die kleinste katalytische RNA und besitzt selbstspaltende bzw. selbstligierende Aktivität. Es wurde erstmals in Satelliten RNAs des *Tobacco ringspot virus* entdeckt, wo es der Prozessierung von multimeren Transkripten der SatRNA in die monomeren Einheiten dient (Prody et al., 1986, Buzayan et al., 1986, Forster und Symons, 1987a). Des Weiteren konnten HHRz in der pflanzenpathogenen Familie der *Avsunviroideae* (Flores und Hernandes, 2000), so z.B. das *Avocado Sunblotch* Viroid (ASBVd) und das *Peach Latent Mosaic* Viroid (PLMVd), und in Satelliten DNA aus *Schistosoma* (Ferbeyre et al., 1998), Amphibien (Epstein et al., 1986) und *Dolychopoda* (Rojas et al., 2000) charakterisiert werden. Allen gemein ist die Funktion der Spaltung von multimeren Transkripten in dessen Monomere.

Die HHRz wurden nach ihrer „Hammerkopf“ ähnlichen Sekundärstruktur benannt, welche in der Minimalstruktur aus einer katalytischen Core-Region und drei flankierenden Helices besteht (Abb. 2.5 A). Die Core-Region besteht aus konservierten Nukleotiden und die Helices haben variable Längen (Foster und Symons, 1987b; Uhlenbeck, 1987). Natürlich vorkommende HHRz werden anhand ihrer Sekundärstruktur in drei verschiedene Typen eingeteilt. Namensgebend ist jeweils die Helix, die nicht durch einen Hairpin Loop geschlossen ist (Abb. 2.5 B-D). Das natürliche Vorkommen aller drei HHRz Typen konnte erst 2011 mit den von Randi Jimenez und Jonathan Perreault gefundenen Typ II HHRz

bestätigt werden (Jimenez et al., 2011; Perreault et al., 2011). Bis zu diesem Zeitpunkt waren nur Typ I und III HHRz bekannt.

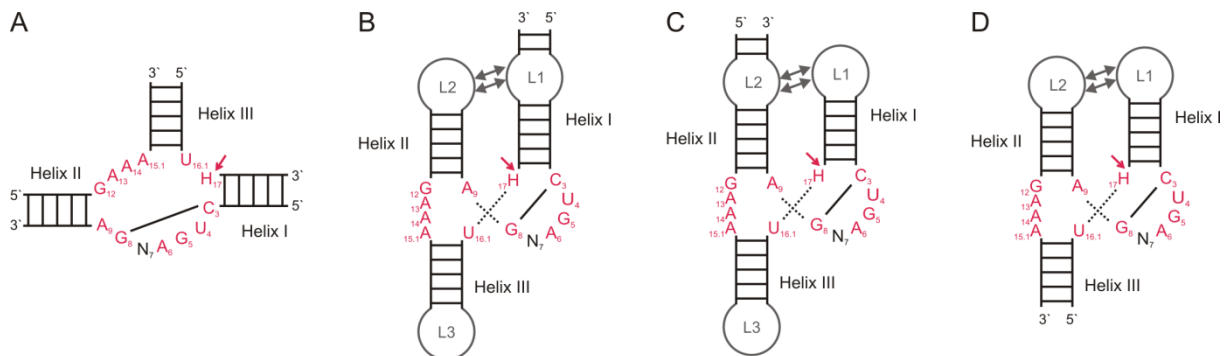


Abb. 2.5: Hammerhead Ribozyme

A Minimalstruktur mit den konservierten Nukleotiden (rot) in der Core-Region und den flankierenden Helices I-III mit variabler Länge. **B-D** Je nach geöffneten Helix werden drei verschiedene HHRz unterschieden: **B** Typ I HHRz mit geöffneten Helix I, **C** Typ II HHRz mit geöffneten Helix II und **D** Typ III HHRz mit geöffneten Helix III. Die für die Spaltung notwendigen Tertiärinteraktionen zwischen ungepaarten Nukleotiden (L1 und L2) sind grau hervorgehoben. Die Nukleotide der konservierten Core-Region sind durchnummeriert (Hertel et al., 1992) und der rote Pfeil kennzeichnet die Spaltstelle zwischen Nukleotid 17 und Nukleotid 1.1. N steht für ein variables Nukleotid und H für A, C oder U.

Die katalytische Aktivität der HHRz ist abhängig von verschiedenen Faktoren, zum einen vom Vorhandensein von divalenten Metall-Ionen und zum anderen von Tertiärinteraktionen zwischen den Loops 1 und 2 bzw. den Helices I und II. Zunächst wurde sich auf die Analyse der kinetischen Eigenschaften der Minimalstruktur des HHRz beschränkt (zusammengefasst in Hammann und Lilley 2002). FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)- und NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Analysen zeigten, dass das Faltungsverhalten der Minimalform in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration in zwei Stufen verläuft (Bassi et al., 1997; Hammann et al., 2001). Dabei kommt es bei einer sub-millimolaren Magnesiumkonzentration von 500 μM zunächst zu einer Konformationsänderung bei der Helix I in räumlicher Nähe zu Helix III ist. Erst bei einer Konzentration von 10 mM MgCl_2 kann die Minimalstruktur des HHRz eine aktive Konformation ausbilden, wobei die Helix I in Richtung Helix II umklappt und die typische Y-förmige Tertiärstruktur ausgebildet wird. Die natürlich vorkommenden HHRz weisen in der Tertiärstruktur über die Hairpin Loops bzw. internen Loops an Helix I und II zusätzliche Interaktionen auf. Diese führen unter anderem zu einer veränderten Metallionenbindung in der Core-Region des HHRz und zu einer effizienten Faltung in die aktive Konformation, wodurch ein Anstieg der Spaltungsgeschwindigkeit bei physiologischen Magnesiumkonzentrationen beobachtet werden konnte (Khvorova et al., 2003; de la Peña et al., 2003; Canny et al., 2004; Penedo et al., 2004). Anhand biochemischer Daten der atomar auflösenden Strukturen konnte gezeigt werden, dass diese tertiären Interaktionen für eine effiziente Spaltung der HHRz nötig sind (Przybilski und Hammann, 2006; Nelson und

Uhlenbeck, 2008) und in einer von Martick und Scott publizierten Kristallstruktur eines natürlichen HHRz resultieren (Martick und Scott, 2006). Die Spaltung und Ligation der HHRz Sequenzen erfolgt zwischen den beiden Nukleotiden H_{17} und $N_{1.1}$. Chemisch betrachtet handelt es sich dabei um eine Umesterungsreaktion und erfolgt nach dem unter 2.3 beschriebenen S_N2 -Reaktionsmechanismus. Die meisten natürlich vorkommenden HHRz sind selbstspaltende bzw. selbstligierende Katalysatoren, die intramolekular - in *cis* wirken (Abb. 2.6 A). Weiterhin können HHRz auch intermolekular - in *trans* wirken, indem sie mit einer Ziel-RNA hybridisieren und diese am 3'-Ende des Spalttriplets (NUH, hierbei entspricht N jedem beliebigen Nukleotid (A, U, C, G) und H den Nukleotiden A, U oder C.) spalten (Abb. 2.6 B). Die Spezifität der Bindung beruht auf der Basenpaarung der Ribozymsequenz mit Nukleotiden in der Umgebungssequenz der Spaltstelle der Ziel-RNA (Sampson et al., 1987; Uhlenbeck, 1987; Luzi et al., 1997; Martick et al., 2008).

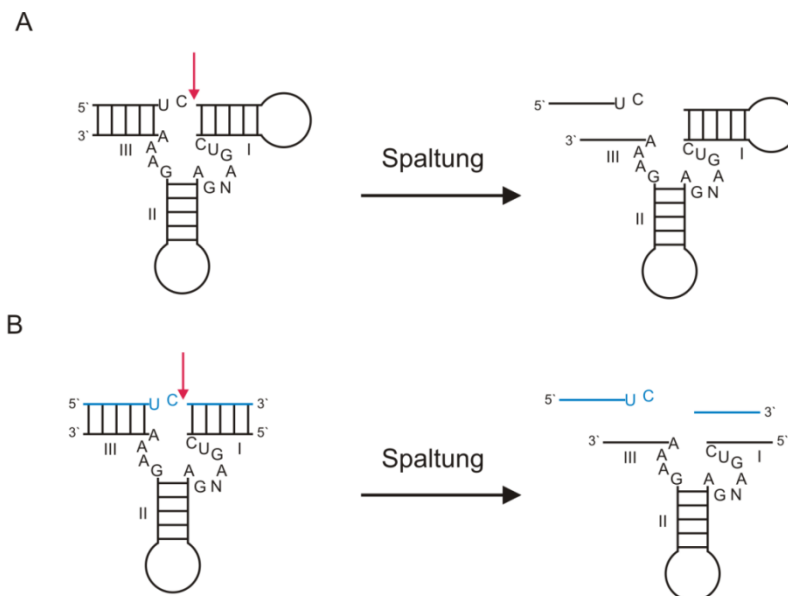


Abb. 2.6: Cis und trans-Spaltung von Hammerhead Ribozymen

A Selbstspaltende Aktivität des HHRz in *cis*. Das HHRz katalysiert die Spaltung seines eigenen Phosphatrückgrats am 3'-Ende der NUH-Spaltstelle. **B** Die in *trans* spaltenden HHRz hybridisieren mit einer Ziel-RNA (blau) und bewirken dessen Spaltung. Die Spaltstelle ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet.

Auf Grund der *cis* und *trans* spaltenden Wirkung der HHRz, könnten sie unter anderem an der Genexpression in zellulären Prozessen involviert sein (Erdmann et al., 2001; He und Hannon, 2004). Diese Funktion wird immer häufiger in der synthetischen Biologie und Biotechnologie zur Entwicklung von Schaltern zur Regulation der Genexpression genutzt. Diese Riboschalter (*riboswitches*) bestehen aus einer Liganden-bindenden Domäne (Aptamerdomäne) und einer Expressionsplattform, die die Genexpression beeinflusst (Lee et al., 2004). Als Expressionsplattform können u.a. HHRz dienen, dessen Selbstspaltung durch eine Verknüpfung mit einem Aptamer Liganden-abhängig katalysiert werden kann (Win und

Smolke, 2008; Wieland et al., 2009). Die Sekundärstruktur der Aptamere wird durch die Bindung des Liganden verändert und beeinflusst dadurch die Faltung der Expressionsplattform. Die ersten natürlichen Genschalter wurden 2002 in bakterieller mRNA entdeckt (Nahvi et al., 2002; Winkler et al., 2002). Die Wirkungsweise ist unabhängig von regulatorischen Proteinen und beruht nur auf Wechselwirkungen zwischen Liganden und RNA (Tucker und Breaker, 2005). In diesem Zusammenhang stellt der in Gram-positiven Bakterien gefundene Riboschalter *glmS* eine besondere Rolle dar. Er ist nicht nur Schalter sondern auch Ribozym und katalysiert über das metabolische Produkt des GlmS-Proteins, Glukosamin-6-phosphat (GlcN6P), die Spaltung der *glmS*-mRNA. Der *glmS*-Riboschalter stellt damit ein multifunktionales Molekül dar, welches enzymatische Aktivität und Regulation in sich vereint (Winkler et al., 2004).

Neben den zweiwertigen Metall-Ionen sind die Tertiärinteraktionen zwischen den Loops 1 und 2 bzw. den Helices I und II für die exakte Faltung und der damit verbundenen Spaltungsaktivität der HHRz verantwortlich. In den letzten Jahren konnte in zahlreichen Experimenten gezeigt werden, dass durch Mutationen einzelner Nukleotide die Tertiärinteraktionen der Loop Bereiche teilweise oder ganz verloren gehen können und dadurch die katalytische Aktivität der Ribozyme unter physiologischen Bedingungen beeinflusst wird. So konnte anhand von Loop Mutationsanalysen der beiden HHRz, Ara1 und Ara2, aus *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden, dass die Tertiärinteraktionen zwischen den Loops die aktive Konformation des Ribozyms stabilisieren (Przybilski et al., 2005). Ähnliche Analysen mit dem natürlichen Hammerhead Ribozymen aus dem *Peach latent mosaic* Viroid (PLMVd), dem *Chrysanthemum chlorotic mottle* Viroid (CChMVd) und der Satelliten-RNA des *Tobacco ringspot* Viruses (sTRSV) unterstreichen diese Aussage und zeigen damit, dass die für die Spaltung notwendige Magnesiumkonzentration im Vergleich zur Minimalstruktur erheblich gesenkt wird (Khvorova et al., 2003; de la Peña et al., 2003; Penedo et al., 2004). Zur Stabilisierung der parallelen Anordnung von Helix I und II können Pseudoknoten zwischen den Helices beteiligt sein, welche ebenfalls Einfluss auf die Spaltungsgeschwindigkeiten der HHRz haben. Pseudoknoten wurden das erste Mal im *turnip yellow mosaic* Virus (TYMV) entdeckt (Rietveld et al., 1982) und stellen eine RNA Tertiärstruktur dar, die aus zwei Haarnadelstrukturen besteht (Stapler und Butcher, 2005). In Mutationsstudien konnte durch eine Verkürzung der Helices die Spaltungsrate im Vergleich zum Wildtyp drastisch reduziert werden (Perreault et al., 2011). Auch die Nukleotide im katalytischen Kern können die Spaltungsaktivität beeinflussen. So ist die Bildung eines Basenpaares zwischen Nukleotid 3 und 8 (N3N8), sowie ein Guanin an Position 5 und ein

Adenin an Position 15 für die katalytische Aktivität der HHRz entscheidend (Ruffner et al., 1990; Przybilski und Hammann, 2007).

2.5 Datenbanksuchen nach genomisch codierten Hammerhead Ribozymen

Mit der Entdeckung der ersten katalytischen RNAs und deren Beteiligung an verschiedensten biologischen Prozessen in der Zelle, erfolgten in den letzten Jahrzehnten genomweite Datenbanksuchen nach Ribozymen (Barrick *et al.*, 2004; Gräf *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2011; Perreault *et al.*, 2011; de la Peña und Garcia-Robles 2010a und 2010b; Seehafer *et al.*, 2011). Möglich machten diese Suchen, die in öffentlich zugänglichen Datenbanken hinterlegten Sequenzen von mehr als 1000 Organismen (Hubbard *et al.*, 2009; Hammesfahr *et al.*, 2011). Mittels der Suchen soll ein Einblick über die Variabilität und Verbreitung der Ribozyme erhalten werden, welche wiederum Aufschluss über den evolutionären Ursprung und mögliche Funktionen geben können. Basierend auf der Tatsache, dass Interaktionen zwischen den Loops1 und 2 bzw. zwischen den Helices I und II für eine effiziente Faltung und schnelle Spaltungskinetiken verantwortlich sind, könnten für die HHRz kombinierte Sequenz- und Strukturbeschreibungen erstellt werden. Mit diesen ist es möglich gezielt Datenbanken nach genomisch codierten HHRz zu durchsuchen. In einer ersten strukturbasierten Suche nach vollständigen Motiven, konnten in *Arabidopsis thaliana* zwei Typ III HHRz (Ara1 und Ara2) in nicht repetitiven Elementen gefunden werden (Gräf *et al.*, 2005). Diese beiden HHRz liegen auf Chromosomen 5 in antisense Orientierung im 3'UTR bzw. zwischen zwei ORFs und sind ca. 5000 bp voneinander entfernt. Ara1 und Ara2 sind zu 99% identisch und sind beide von einer hochkonservierten Konsensussequenz (zu 95% identisch) umgeben. Beide HHRz Motive werden in *planta* exprimiert und zeigen katalytische Aktivität (Przybilski *et al.*, 2005). Die von de la Peña und Garcia-Robles beschriebene Suche nach HHRz beruht auf einer verkürzten Motivsuche über die NCBI-BLAST-Funktion, anschließender Sekundärstrukturanalyse und Erweiterung der gefundenen Sequenzen (de la Peña und Garcia-Robles 2010a und 2010b). Hingegen verwendeten die Gruppe von Ronald Breaker eine Kombination aus genomischen Suchprogrammen (Weinberg *et al.*, 2010) zur Identifizierung von HHRz, bestehend aus Homologiesuchen (Weinberg und Ruzzo, 2006), dem auf der Sekundärstruktur basierenden Algorithmus RNAMotif (Macke *et al.*, 2001) und dem Algorithmus CMFinder, welche zunächst Sekundärstrukturelemente aus homologen Sequenzen generiert (Yao *et al.*, 2006). Auch die von Seehafer durchgeführte Suche kombiniert verschiedene Suchprogramme und –algorithmen, wobei auf Details im nächsten Abschnitt eingegangen werden soll. Allen gemein ist die enorme Zahl an neu gefundenen

HHRz Motiven vor allem in eukaryotischen und bakteriellen Genomen. Mit einigen Ausnahmen konnten die meisten HHRz in repetitiven DNA Sequenzen oder in Introns von Protein-codierenden Sequenzen gefunden werden. Jedoch kann anhand dieser Suchen nicht zwischen HHRz unterschieden werden, die nur den Musterbeschreibungen entsprechen und solchen die katalytisch funktionell sind. Dies beruht darauf, dass die Sequenzähnlichkeiten nicht zwingend etwas über die Funktionalität der HHRz aussagen, sondern die Funktion auf der Sekundär- und Tertiärstruktur basiert (Reeder und Giegerich, 2009).

2.5.1 RNAhit

Bei RNAhit handelt es sich um ein von Carsten Seehafer entwickeltes Programm zur Identifizierung von genomisch codierten HHRz (Seehafer, 2012). Es basiert auf Sequenz- und Strukturmotiven sowie auf thermodynamischen Faltungsparametern. Zunächst wurden öffentlich zugängliche Datenbanken unter Nutzung eines sequenz- und strukturbasierten Deskriptors (s. Abb. 2.7) und des Analyseprogramms RNAbob (Eddy, 2005) auf Typ III HHRz Motive durchsucht. Das Programm RNAbob verwendet einen graphentheoretischen Ansatz mit genauer Definition der einzelnen Elemente. Basenpaarungen der Helices werden mit $h-h^{\circ}$ oder $r-r^{\circ}$ gekennzeichnet, h erlaubt neben Watson-Crick auch Wobble Basenpaarungen und r erlaubt ausschließlich Watson-Crick Basenpaare. Die einzelsträngigen Loop Bereiche bzw. Core-Nukleotide werden mit s beschrieben und die Basen werden durch IUPAC-Symbole (Cornish-Bowden, 1985) definiert. Mit Hilfe dieses sequenz- und strukturbasierten Deskriptors konnten in einer genomweiten Suche mehr als 620000 primäre Treffer für Typ III HHRz gefunden werden, wobei der Großteil der Treffer aus eukaryotischen Genomen stammt (96%). Um aus der Vielzahl der Treffer katalytisch aktive HHRz zu identifizieren, werden in einem nächsten Schritt, unter Nutzung einer Analysepipeline (s. Abb. 2.8), thermodynamische Faltungsparameter für jeden einzelnen Treffer bestimmt. Mit Hilfe des Programmes Mfold (Zuker, 2003) werden für jeden Kandidaten die Faltungsenergien von zwei verschiedenen Sekundärstrukturen bestimmt: zum einen die der freien Faltung nach dem Kriterium der minimalen Faltungsenergie ($\Delta G^0_{37^{\circ}\text{C}, \text{free}}$) und zum anderen die mit Vorgabe in ein HHRz zu falten ($\Delta G^0_{37^{\circ}\text{C}, \text{motiv}}$). Die Faltung in eine erzwungene Struktur ($\Delta G^0_{37^{\circ}\text{C}, \text{motiv}}$) erfolgte anhand von zuvor berechneten Constrains des Programmes RNAbob. Die Constrains beruhen auf einer anderen Darstellungsweise der Sekundärstruktur und werden anhand einer Punkt-Klammer-Struktur ausgegeben. Punkte stellen dabei Einzelstrangregionen und Klammern Doppelstrangregionen (Helices) dar.

Liegen alle Faltungsergebnisse vor, erfolgt in einem weiteren Schritt anhand gegebener Parameter die Filterung der HHRz Treffer in einer festgelegten Reihenfolge.

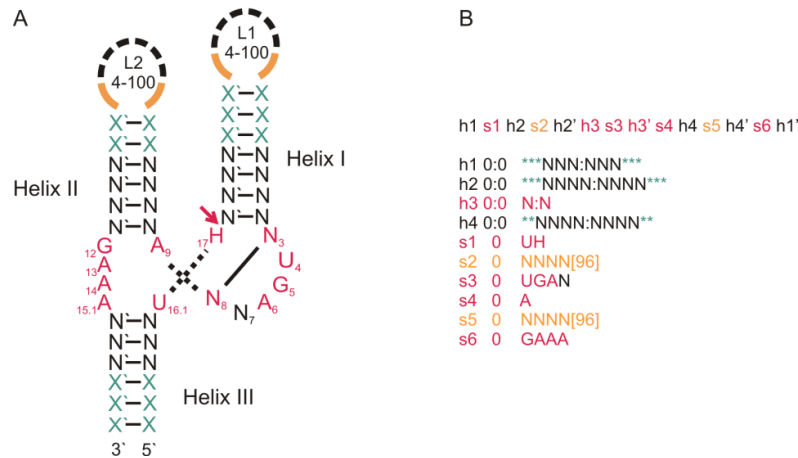


Abb. 2.7: Sequenz- und Strukturbeschreibung für Datenbanksuchen nach Typ III HHRz

A Sekundärstrukturbeschreibung eines Typ III HHRz. Die Nukleotide des katalytischen Kerns sind rot hervorgehoben und die Spaltstelle H₁₇ (A, C, U) durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die grün hervorgehobenen Basenpaarungen (X-X') bezeichnen fakultative Positionen und können genau wie N für alle 4 Basen stehen (A, C, G, U). **B** Musterbeschreibung für das Suchprogramm. Die Helices werden von hx und hx' (x = 1-4) gebildet und sy (y = 1-6) definiert einzelsträngige Bereiche. Sterne stehen für alternative Positionen, welche auch in eckigen Klammern angegeben werden können. Die Fehlpaarungen im Einzelstrang werden durch den Ausdruck 0 und in den Helices durch 0:0 verhindert.

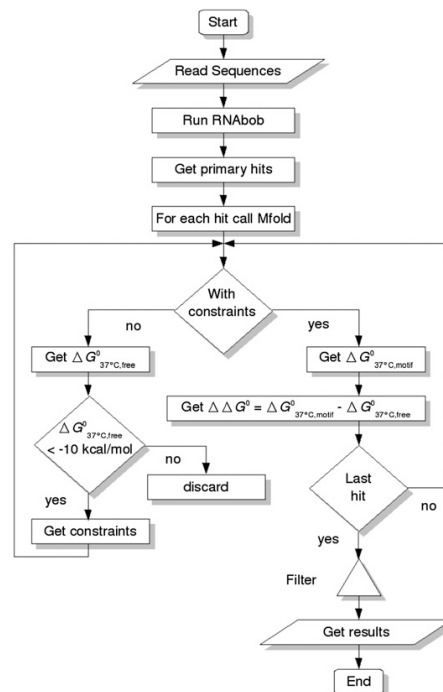


Abb. 2.8: Analysepipeline des Programms RNAhit

Die Analysepipeline besteht aus einer Kombination verschiedener Programme, die es ermöglichen die freien und erzwungenen Faltungsparameter für jeden primären Treffer zu bestimmen. Anschließend werden die erhaltenen Treffer nach im Text beschriebenen Kriterien gefiltert und resultieren in einer Anzahl an einzigartigen und potentiell aktiven Typ III HHRz (Abb. aus Seehafer *et al.*, 2011).

Als erstes werden alle Treffer mit einem $\Delta G^0_{37^\circ\text{C}, \text{free}}$ -Wert von größer als -10 kcal/mol entfernt, da diese wahrscheinlich eine zu geringe Stabilität besitzen und sich nicht in die vorhergesagte Struktur falten. Woraufhin in einem nächsten Filterschritt der $\Delta\Delta G$ -Wert aus der Differenz des $\Delta G^0_{\text{motiv}}$ -Wertes und des ΔG^0_{free} -Wertes berechnet wird und alle Treffer herausgefiltert werden dessen $\Delta\Delta G$ -Wert größer oder gleich 0,5 kcal/mol ist. Bei überlappenden Treffern werden die mit dem größten $\Delta\Delta G$ -Wert entfernt. In einem abschließenden Schritt werden alle Treffer die eine 100%ige Sequenzübereinstimmung zu einem anderen Treffer in diesem Organismus zeigen gezählt und anschließend entfernt, so dass am Ende nur einzigartige Treffer vom Programm RNAhit ausgegeben werden. Nach Anwendung dieser Analysepipeline konnte die primäre Trefferzahl auf 40112 potentiell katalytisch aktive Ribozyme reduziert werden. Die gefundenen Treffer sind in Bezug auf die Sequenz und deren Länge sehr heterogen und im Genom unterschiedlich lokalisiert. Sie kommen am häufigsten in repetitiven und intergenischen Regionen vor, wobei sie auch im Intron lokalisiert sein können. Dies wiederum impliziert die Annahme, dass HHRz unterschiedlichen Ursprungs sind (Salehi-Ashtiani und Szostak, 2001). Die gewählten Filtereinstellungen konnten in einer vorherigen Suche, mit einem veränderten Deskriptor ($\text{C}_3\text{U}_4\text{G}_5\text{A}_6\text{N}_7\text{G}_8\text{A}_9$), bereits überprüft werden (Seehafer et al., 2011). Dabei wurden als Kontrolle zusätzlich 2877 Einträge der *subviral* Datenbank (Rocheleu und Pelchat, 2006) durchsucht, welche mehr als 100 bekannte Typ III HHRz Sequenzen aus Satelliten RNA und Viroiden enthält (Tabler und Tsagris, 2004). Nach Anwendung der Analysepipeline und den entsprechenden Filterschritten konnten neben 160 neuen HHRz, die 124 bereits bekannten Typ III HHRz identifiziert werden. 122 Treffer stammen von den subviralen Pflanzenpathogenen (Prody et al., 1986) und die anderen beiden sind die bekannten Typ III HHRz Ara1 und Ara2 aus *Arabidopsis thaliana* (Przybilski et al., 2005). Dies bedeutet, dass die angewandten Filterschritte eine Trennung zwischen falsch positiven und positiven Treffern ermöglichen können. Doch letztendlich bleibt nur die experimentelle Analyse der einzelnen Motive, um Aussagen über die katalytische Aktivität eines HHRz treffen zu können.

2.6. Der Modellorganismus *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium discoideum wurde 1935 von K.B. Raper entdeckt (Raper, 1935). Er ist ein einzelliger Bodenorganismus der sich phagozytotisch von Bodenbakterien ernährt und sich mit Pseudopodien amöboid fortbewegen kann. Das haploide Genom von *D. discoideum* ist in sechs Chromosomen organisiert, weist einen A/T Gehalt von 78% auf und umfasst 34 Mbp (Eichinger et al. 2005). Der in dieser Arbeit verwendete Ax2-Stamm ist eine für

Laborzwecke generierte Mutante, die auch axenisch in flüssigen Medium über Pinocytose wachsen kann. Das Besondere an *D. discoideum* ist seine Verwandlung vom Einzeller zum echten Vielzeller unter Nahrungsmangel. Dadurch wird ein asexueller Entwicklungszyklus begünstigt, der auf Kosten einzelner Zellen dem Erhalt der Spezies dient (Urushihara, 2008). Nahrungsmangel bewirkt die Freisetzung von cAMP als Botenstoff und führt zur Aggregation

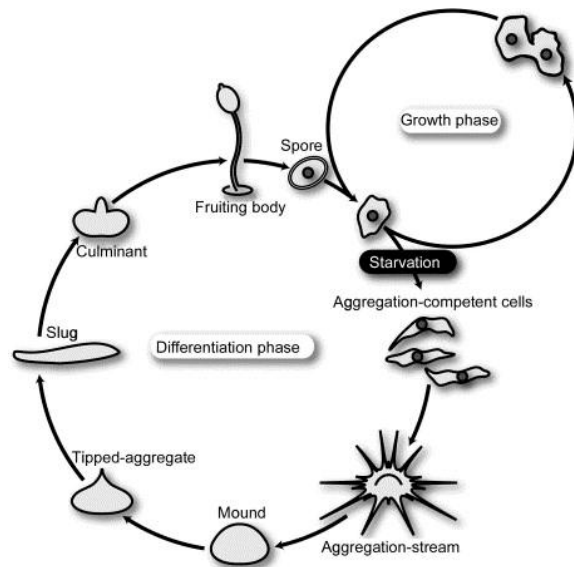


Abb. 2.9: Entwicklungszyklus von *D. discoideum*
(Abbildung aus Maeda, 2005)

von ca. 10^5 Einzelindividuen (Gerisch and Malchow, 1976), das so entstandene Pseudoplasmodium durchläuft definierte Entwicklungsstadien und mündet in die Ausbildung eines Fruchtkörpers, bestehend aus toten Stielzellen und überdauerungsfähigen Sporenzellen. Bei ausreichendem Nahrungsangebot schließt sich der asexuelle Entwicklungszyklus mit der Sporengermination (Abb. 2.9). Der Organismus *D. discoideum* verfügt über mehrere Vorzüge als

molekularbiologisches Untersuchungsobjekt. So kann es relativ leicht und in großen Mengen kultiviert und in Form von Sporen über mehrere Jahre gelagert werden. Das Methodenspektrum ist dem von *Saccharomyces cerevisiae* ähnlich, jedoch verfügt *D. discoideum* im Gegensatz zur Hefe auch über Eigenschaften eines vielzelligen Lebewesens. So können an auch an diesem haploiden Organismus viele gentechnische Methoden wie das Erzeugen von *knock-out* Mutanten über homologe Rekombination und *knock-down* Experimente angewendet werden. Des Weiteren ist *D. discoideum* ein etabliertes Expressionssystem für rekombinante Proteine (Linskens et al., 1999; Malnasi-Csizmadia et al., 2000).

3. Zielstellung

Mittels genomweiten Datenbanksuchen in den letzten Jahrzehnten konnte eine Vielzahl von Hammerhead Ribozymen in allen Domänen des Lebens identifiziert werden (Barrick *et al.*, 2004; Gräf *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2011; Perreault *et al.*, 2011; de la Peña und Garcia-Robles 2010a und 2010b; Seehafer *et al.*, 2011). Anhand des von Carsten Seehafer entwickelten Programms RNAhit konnte mittels eines struktur- und sequenzbasierten Deskriptors und einer auf thermodynamischen Parametern basierenden Analysepipeline eine Vielzahl neuer Typ III Hammerhead Ribozyme identifiziert werden (Seehafer, 2012). Ziel der vorliegenden Arbeit war es durch experimentelle Analysen die Filterschritte zu optimieren und somit aus der Vielzahl der Treffer katalytisch aktive HHRz zu identifizieren. Dabei soll anhand ausgewählter Typ III HHRz aus *Xenopus tropicalis*, *Arabidopsis thaliana* und *Arabidopsis lyrata* zunächst die katalytische Aktivität in *in vitro* Spaltungsanalysen untersucht werden und basierend auf den Ergebnissen in einem anschließenden Vergleich der Sequenzen, Sekundärstrukturen und thermodynamischen Parametern der einzelnen HHRz die Analysepipeline optimiert werden. Des Weiteren sollen die neu identifizierten HHRz auf genomischer DNA amplifiziert und deren katalytische Aktivität in Abhängigkeit ihrer genomischen Umgebungssequenz analysiert werden. Weiterhin soll die Expression der Typ III HHRz aus *Xenopus tropicalis* in verschiedenen Geweben mittels S1 Nuklease Protektionassay und Northern Blot Analysen untersucht werden.

Die für die katalytische Aktivität verantwortlichen tertiären Interaktionen der Loop1 und 2 Sequenzen sollen *in vitro* und *in vivo* anhand verschiedener PolyC-Loop Mutanten untersucht werden. Für die *in vivo* Analysen unter physiologischen Bedingungen soll das von Stephan Wiegand (Wiegand, 2012) entwickelte β -Gal Reportersystem in dem Einzeller *Dictyostelium discoideum* genutzt und für die Untersuchungen der katalytischen Aktivität von HHRz etabliert werden.

Mittels der Suchen und experimentellen Analysen soll ein Einblick über die Variabilität und Verbreitung der Ribozyme erhalten werden, welche wiederum Aufschluss über den evolutionären Ursprung und mögliche Funktionen geben können.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Analysewaage	Mettler H31, Giessen
Autoklav (3870 ELVC)	Tuttnauer, Wesel
Binokular	Zeiss, Jena
Brutschrank	Adolf Kühner, Schweiz
Elektroporator (ECM 630)	BTX Harvard Apparatus, Holliston, USA
Geldokumentation	Intas, Göttingen
Geigerzähler (Mini-Monitor)	Mini-Instruments, GB
Gelelektrophorese-Kammern:	
Agarosegele	Metallwerkstatt, Universität Kassel
PAA-Gele	Mupid-One, Advance
Heizblock	Metallwerkstatt, Uni Kassel
Hybridisierungsöfen:	Biosan Themoshaker, Riga Lettland
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen
Kulturenschüttler	Schütt, Göttingen
Magnetrührer	Heatstir CB162, Carl Stuart Ltd., Dublin, Irland
Mikroliter-Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Discovery Comfort, Abimed, Langenfeld
Mikroliter-Pipetten (5000 µl)	Pipet4u, AHN Biotechnologie, Nordhausen
Mikrowelle (Lunik 250)	Aldi, Essen
pH Meter	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Pipettierhilfe	Rota-Filler 3000, Heathrow S., Illinois USA
PhosphoImager	Fujifilm, Düsseldorf
Photometer	Biophotometer plus, Eppendorf, Hamburg
Schüttler für 1,5 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Spannungsgeräte:	EPS 200, EPS 600, EPS 3500, Parmacia Biotech, Freiburg

Sterilbänke:

Sterilbank (*E. coli*)

Gelaire NB 36, Gelman Instruments,
Italien

Sterilbank (*D. discoideum*)

Heraeus HB 2448, Analytik, Saarbrücken

Thermocycler:

FlexCycler, Analytik Jena

Mastercycler EP gradient S, Eppendorf,
Hamburg

UV-Tisch

BioStep UST-20L-8PA, Jahnsdorf

UV-Crosslinker (Biolink DNA Crosslinker)

Biometra, Göttingen

Vortex

Scientific Industries, New York USA

Wasserbad

Memmert, Schwabach

Zentrifugen:

Centrifuge 5415R

Eppendorf, Hamburg

Centrifuge 5417C

Eppendorf, Hamburg

Centrifuge 5424

Eppendorf, Hamburg

Multifuge 1 S-R

Heraeus, Hanau

Rotina 380 R

Hettich, Tuttlingen

Sprout[®] Mini-Centrifuge

Heathrow Scientific, Northgate, UK

Universal 32

Hettich, Tuttlingen

Zytometer

Coulter Counter ZM, Beckman GmbH,
Krefeld

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Cryoröhrchen

Nunc, Wiesbaden

Einmalhandschuhe (Hansa Medical)

Kirchhoff Group, Hamburg

Einmalküvette

Sarstedt, Nümbrecht

Einmalskalpell

Bayha, Tuttlingen

Einwegspritzen

Ominfix-F 1ml B. Braun, Melsungen

Einwegtücher

Kimberly-Clark, Forchheim

Elektroporationsküvetten

Gene Pulser[®] 0,4 cm, VWR, Darmstadt

Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)

Sarstedt, Nümbrecht

Faltenfilter (ø15 cm, 5-8 µm)

Roth, Karlsruhe

Glaswolle

Roth, Karlsruhe

Parafilm

Schütt, Göttingen

PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen (10 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter (0,2 µm; 0.45 µm)	Sarstedt, Nümbrecht

4.1.3 Kits und Enzyme

Die verwendeten molekularbiologischen “Kits“ wurden von den Firmen MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, www.fermentas.de), PEQLAB Biotechnologie GMBH (Erlangen, www.peqlab.de), Promega GmbH (Mannheim, www.promega.com), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, www.sigma-aldrich.com) geliefert. Die verwendete *Taq*-DNA-Polymerase wurde uns freundlicherweise von der AG Prof. Dr. Nellen (Institut für Genetik, Universität Kassel) zur Verfügung gestellt.

Kits

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega, Mannheim

Enzyme

DNase I (RNase-frei; #EN0521)	Fermentas, St. Leon-Rot
FastAP™ Thermosensitive Alkalische Phosphatase (#EF0651)	Fermentas, St. Leon-Rot
Maxima™ Reverse Transkriptase (#EP0741)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Universität Kassel, Kassel
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>XhoI</i> (#ER0691)	
<i>XbaI</i> (#ER0681)	
<i>BcuI/SpeI</i> (#ER1251)	
<i>Sall</i> (#ER0645)	
RiboLock™ RNase Inhibitor (#EO0381)	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A (DNase-, Protease-frei; #EN0531)	Fermentas, St. Leon-Rot
S1 Nuklease (#EN0321)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Universität Kassel, Kassel

T4 DNA Ligase (#EL0012)	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Polynukleotid Kinase (#EK0031)	Fermentas, St. Leon-Rot
T7 RNA Polymerase (#EP0111)	Fermentas, St. Leon-Rot

Enzympuffer

10 x <i>Taq</i> Puffer (KCl, 15 mM MgCl ₂ ; #B16)	Fermentas, St. Leon-Rot
10 x Orange Puffer (#BO5)	Fermentas, St. Leon-Rot
10 x Tango TM Puffer (#BY5)	Fermentas, St. Leon-Rot
10 x Red Puffer (#BR5)	Fermentas, St. Leon-Rot
5 x RT Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
10 x Puffer A PNK	Fermentas, St. Leon-Rot
5 x S1 Nuklease Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
10 x DNaseI Puffer mit MgCl ₂ (#B43)	Fermentas, St. Leon-Rot

4.1.4 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders beschrieben, von den Firmen Biozym Diagnostics GmbH (Oldendorf, www.biozym.com), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, www.carl-roth.de), ForMediumTM (Norfolk, www.formedium.com), GE Healthcare (München, www.gehealthcare.com), Life Technologies GmbH (Darmstadt, www.invitrogen.com), Merck Euro-lab GmbH (Darmstadt, www.merckeurolab.de) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, www.sigma-aldrich.com) bezogen und zeichneten sich durch den Reinheitsgrad „*pro analysis*“ aus.

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumthiocyanat	Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz (Roti [®] -Quant)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Fluka, Deisenhofen
BSA	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe

Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
1,4-Dithiothreit (DTT)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (99%)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruh
Ethanol >99,8%	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HL5 Medium	ForMedium, Norfolk, Großbritannien
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isopropanol (99%)	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Fluka, Deisenhofen
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Nonident [®] P40 (NP40)	Fluka, Deisenhofen

ONPG	Roth, Karlsruhe
Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
pH- Standardlösungen 4, 7, 10	Fluka, Deisenhofen
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol 8000 (PEG)	ICN Biomedicals, Ohio
Polyvinylpyrrolidon K30	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese [®] Gel 40 (19:1)	Roth, Karlsruhe
Roti [®] -Aqua-Phenol	Roth, Karlsruhe
Roti [®] -Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Roti [®] -Quant (Bradford Reagenz)	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37%	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
Sephadex [™] G-50 fine	GE Healthcare, München
Spermidin	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-Acetat	Roth-Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
TRIzol [®] -Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Fluka, Deisenhofen

4.1.5 Antibiotika

Amphotericin (0,25 mg/ml)	PAA, Cölbe
Ampicillin (50 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Genitacin G418 (100 mg/ml)	PAA, Cölbe
Penicillin (10000 u/ml)	PAA, Cölbe
Streptomycin (10 mg/ml)	PAA, Cölbe

4.1.6 Medien

Medien für *Escherichia coli*:

LB-Medium, pH 7,0	1% (w/v) Bacto-Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 85,5 mM NaCl pH-Wert mit HCl oder NaOH eingestellt und autoklaviert
LB-Amp-Medium	50 µg/ml Ampicillin in LB-Medium
LB-Agar	1,3% (w/v) Agar-Agar in LB-Medium pH-Wert mit HCl oder NaOH eingestellt und autoklaviert
LB-Amp-Agar	50 µg/ml Ampicillin in LB-Agar

Medien für *Dictyostelium discoideum*:

AX-Medium (HL5), pH 6,5	0,1 M Glucose 1,43% (w/v) Bacto-Peptone 0,72% (w/v) Hefeextrakt 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 3,6 mM KH ₂ PO ₄ pH-Wert mit HCl oder NaOH eingestellt und autoklaviert
G0-Medium	50 µg/l Ampicillin 0,25 µg/l Amphotericin 10000 u/l Penicillin 10 µg/l Streptomycin in AX-Medium

G10-Medium	10 µg/ml Genitacin (G418) in G0-Medium
Phosphatagar	1,3% (w/v) Agar-Agar in Soerensen-Phosphatpuffer

4.1.7 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit entsalztem Wasser, welches durch eine Wasseraufbereitungsanlage gefiltert wurde, hergestellt.

CTAB-Puffer (2 x)	2% (w/v) CTAB 1,4 M NaCl 20 mM EDTA (pH 8,0) 100 mM Tris-HCl (pH8,0) 1% (w/v) PVP steril filtriert
DNA-Ladepuffer (6 x)	20 mM Tris/HCl pH 8,0 120 mM EDTA 40 – 60 % (v/v) Glycerin 0,1% (w/v) Bromphenolblau 0,1% (w/v) Xylencyanol
Elektroporationspuffer (<i>Dictyostelium</i>)	10 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM Sucrose
Elutionspuffer	40% (w/v) Formamid 0,7% (w/v) SDS in 1 x TE-Puffer
Ethidiumbromid-Lösung	1% (w/v) Ethidiumbromid
Hybridisierungspuffer	75% Formamid 40 mM HEPES pH 6,4 1 mM EDTA pH 8,0 400 mM NaCl

IPTG-Stammlösung	500 mM Isopropyl- β -D-thiogalactosid steril filtriert
Ligationspuffer (2 x)	60 mM Tris/HCl, pH 7,8 20 mM MgCl ₂ 20 mM DTT 2 mM ATP 10% (v/v) PEG 8000
Lösung I (Plasmidpräparation)	25 mM Tris/HCl 10 mM EDTA pH 7,4
Lösung II	0,2 M NaOH 1% (w/v) SDS
Lösung III	3 M NaAc pH 4.7
Lysepuffer (<i>Xenopus tropicalis</i>)	100 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 8,6 50 mM EDTA, pH 8,0 0,5% (w/v) SDS
ONPG-Lösung	4% (w/v) ONPG in Phosphatpuffer pH 7,0
PAA-Stocklösung	7 M Harnstoff 10% / 15% / 20% Rotiphorese® Gel40 20% (v/v) 5 x TBE-Puffer Lösung steril filtriert
RNA-Ladepuffer (2 x)	95% (v/v) Formamid 0,025% (w/v) Bromphenolblau 0,025% (w/v) Xylenyanol 0,5 mM EDTA

RT-MgCl ₂ -Puffer (10 x)	500 m Tris/HCl pH 8,6 600 mM NaCl 100 mM DTT
Soerensen Phosphatpuffer (1 x), pH 6,0	2 mM Na ₂ HPO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄ pH-Wert mit Phosphorsäure oder NaOH eingestellt und autoklaviert
Sephadex G50-Lösung	5% (w/v) Sephadex G50 fine in 50 ml 1 x TE-Puffer autoklaviert
Spaltungspuffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 10 mM NaCl 0,1 mM EDTA pH 8,0
TBE (5 x)	445 mM Tris 445 mM Borsäure 10 mM EDTA pH 8.0
TfbI Puffer	30 mM Kaliumacetat 100 mM RbCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 15% (v/v) Glycerin pH 5.8 mit verdünnter Essigsäure eingestellt und Lösung steril filtriert
TfbII Puffer	10 mM MOPS 10 mM RbCl ₂ 75 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerin pH auf 6.5 mit KOH eingestellt und Lösung steril filtriert

TE-Puffer (1 x)	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8,0
Transkriptionspuffer (10 x)	400 mM Tris/HCl pH 8,0 50 mM MgCl ₂ / 200 mM MgCl ₂ 20 mM Spermidin 0,1% (v/v) Triton-X-100 Lösung steril filtriert
Trizol [®]	38% (v/v) Phenol 0,8 M Guanidinthiocyanat 0,4 M Ammoniumthiocyanat 0,1 M Natriumacetat pH 5,0 5% (v/v) Glycerin
X-Gal-Stammlösung (50 mg ml ⁻¹)	50 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid in 1 ml N,N'-Dimethylformamid lösen, in lichtgeschütztem Gefäß bei –20°C gelagert
Zell-Lysepuffer (für <i>Dictyostelium</i>)	1% (w/v) NP40 in Phosphatpuffer pH 7,0
Z-Puffer	100 mM Phosphatpuffer pH 7,0 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 7 ml/l β-Mercaptoethanol

4.1.8 Nukleotide

Desoxyribonukleotide

dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Fermentas, St. Leon-Rot

Ribonukleotide

rATP, rCTP, rGTP, rUTP

Fermentas, St. Leon-Rot

[α^{32} P] UTP (3000Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l)

Hartmann Analytic, Braunschweig

[γ^{32} P] ATP (5000Ci/mmol, 20 μ Ci/ μ l)

Hartmann Analytic, Braunschweig

4.1.9 Oligonukleotide

Rekursive PCR

Xetr1 WT for1

TAATACGACTCACTATAGGG

Xetr1 WT for2

TAATACGACTCACTATAGGGACCGGTCTGTAGTTGGGAGTCTGATCAGTTATTATCCTGGCTGTTG

Xetr1 G17 for2

TAATACGACTCACTATAGGGACCGGTGTGTAGTTGGGAGTCTGATCAGTTATTATCCTGGCTGTTG

Xetr1 WT rev1

ACCGGTTTCGCCCTTCTTGGGGCTCATCAGTGTAGTTTTGAAGCAACAGCCAGGATAATAACTG

Xetr1 WT rev2

ACCGGTTTCGCCCTTC

Xetr2 WT for1

TAATACGACTCACTATAGGC

Xetr2 WT for2

GTCTGTAGTTGGGAATCTGATCAGCTATTATCCTGGCTTTTGC

Xetr2 G17 for2

GTGTGTAGTTGGGAATCTGATCAGCTATTATCCTGGCTTTTGC

Xetr2 WT for3

GAAAACCTGCACTACACTGATGAGCCCCAAGAAGGGCGAAACCGG

Xetr2 WT rev1

CAGATTCCCAACTACAGACCGGGCCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr2 G17 rev1

CAGATTCCCAACTACACACCGGGCCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr2 WT rev2

GTGTAGTGCAGGGTTTTCTGATCAGCTTAGCTTTTTGAAGCAAAAGCCAGGATAATAG

Xetr2 WT rev3

CCGGTTTCGCCCTTC

Xetr2 L2pC for3

GAAAACCCCGCACTACACTGATGAGCCCCCCCCCGGGCGAAACCGG

Xetr2 L2pC rev3

CCGGTTTCGCCCCC

Xetr3 WT for1

TAATACGACTCACTATAGCG

Xetr3 WT for2

GCTGGCAAGTTCTTTCCGCTAATTTAAATAATAGTCTACAGGTCTGAAGATG

Xetr3 WT for3

ATATCATGTTAATTGATTATCACGAGCAGAAATGTGGCGC

Xetr3 WT rev1

GGAAAGAACTTGCCAGCATTATTTAAATTAATATAAAAAGGTGATACGGCGCTATAGTGAGTCGTA
TTA

Xetr3 G17 rev1

GGAAAGAACTTGCCAGCATTATTTAAATTAATATAAAAAGGTGATACGGCGCTATAGTGAGTCGTA
TTA

Xetr3 WT rev2

GATAAATCAATTACATGATATGAGCATCTTCAGACCTGTAGAC

Xetr3 WT rev3

GCGCCACATTTCTGCT

Xetr4 WT for1

TAATACGACTCACTATAGGC

Xetr4 WT for2

GTTGGGAATTTGTATGATGCAGTTTCCTCAACCCTAATGATTTGTTTGTGAATTCACAC

Xetr4 WT for3

CAGAAAAACTGCACTACACTGACGAGCCCCAAAAAGGGCGAAACTGGC

Xetr4 WT rev1

GCATCATACAAATTCCCAACTACAGACCGGCGCCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr4 G17 rev1

GCATCATACAAATTCCCAACTACACACCGGCGCCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr4 WT rev2

GTGTAGTGCAGTGTTTTCTGATCAGCTTAGGTAGAGCCATAAGTGTGAATTCACAAACAAATC

Xetr4 WT rev3

GCCAGTTTCGCCCTTTTGG

Xetr5 WT for1

TAATACGACTCACTATAGGC

Xetr5 WT for2TAATACGACTCACTATAGGCTGTGTCTGCAGCTGCCACGTGCCAGAGAGGGTGTGCCCATTCCC
CTC**Xetr5 G17 for2**TAATACGACTCACTATAGGCTGTGTGTGCAGCTGCCACGTGCCAGAGAGGGTGTGCCCATTCCC
CTC**Xetr5 WT rev1**

TGTGTTTCGTCCTGTTTGGGACTCATCAGTGCAGCGCGGCCACGAGGGGAATGGGCAC

Xetr5 WT rev2

TGTGTTTCGTCCTGTTTGG

Xetr5 L1pC for2TAATACGACTCACTATAGGCTGTGTCTGCAGCCGCCACGTGCCAGAGAGGGTGTGCCCATTCCC
CTC**Xetr5 L1pC rev1**

TGTGTTTCGTCCTGTTTGGGACTCATCAGTGCAGCGGGGCCACGAGGGGAATGGGCAC

Xetr5 L2pC rev1

TGTGTTTCGTCCGGGGGGGACTCATCAGTGCAGCGCGGCCACGAGGGGAATGGGCAC

Xetr5 L2pC rev2

TGTGTTTCGTCCGGGGGGGGAC

Xetr6 WT for1

TAATACGACTCACTATAGGG

Xetr6 WT for2

GCCTTCACATGTACTTTTAGTATAAAACATGAATGTAAAAAGGCCTGAAGAGAAAGATAAG

Xetr6 WT for03

CTGAAGTCAAAGATTAATAGTTTTTTGGCTGCTGGAGGAGTTTTTTGAAAAGTGGCC

Xetr6 WT rev1

CTAAAAGTACATGTGAAGGCCAACTGCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr6 G17 rev1

CTAAAAGTACATGTGAAGGCCAACTGCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr6 WT rev2

CTATTAATCTTTGCAGTTCAGATTTTTCTGTTATTGTTACTTTTTATTACTTATCTTTCTCTTCAGGC

Xetr6 WT rev3

GGGCAGTTTTCAAAAAACTC

Xetr7 WT for1

TAATACGACTCACTATAGGG

Xetr7 WT for2

GGTCTGTAGTTGGGAATCTTGACTTGTTTGTGAATCCCCACTCCTG

Xetr7 G17 for2

GGTGTGTAGTTGGGAATCTTGACTTGTTTGTGAATCCCCACTCCTG

Xetr7 WT for3

CTGCACTACACTGATGAGCCCCAATAAGGGCGAAACCGGT

Xetr7 WT rev1

GATTCCCAACTACAGACCGGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr7 G17 rev1

GATTCCCAACTACACACCGGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr7 WT rev2

CTCATCAGTGTAGTGCAGGGTGTTCTGATCAGCTTAGGTAGAGCCAGGAGTGGGGATTAC

Xetr7 WT rev3

ACCGGTTTCGCCCTTA

Xetr8 WT for1

TAATACGACTCACTATAGGG

Xetr8 WT for2

GGTCTGTAGTTGGGAATCTTGACTTGTTTGTGAATCCCCACTCCTG

Xetr8 G17 for2

GGTGTGTAGTTGGGAATCTTGACTTGTTTGTGAATCCCCACTCCTG

Xetr8 WT for3

CTGCACTACACTGATGAGCCCCCAAGAAGGGCGAAACCGGT

Xetr8 WT rev1

GATTCCCAACTACAGACCGGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr8 G17 rev1

GATTCCCAACTACACACCGGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr8 WT rev2

CTCATCAGTGTAGTGCAGGGTGTTCTGATCAGCTTAGGTAGAGCCAGGAGTGGGGATTAC

Xetr8 WT rev3

ACCGGTTTCGCCCTTC

Xetr9 WT for1

TAATACGACTCACTATAGGG

Xetr9 WT for2

GTGTGCACACAAAATGGCGCATAATCATAATTGCGTCAGTTTGTGTGCTGC

Xetr9 WT for3

CATATCTTGCTAGGAACACTTTAAATGCTAAGGGCCACTGTATCATGAAATGC

Xetr9 WT rev1

GCCATTTTGTGTGCACACGCAATTGCATATGCCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr9 G17 rev1

GCCATTTTGTGTGCACACGCAATTGCATCTGCCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr9 WT rev2

GTGTTCTAGCAAGATATGACACAGTGGGGCTCATTTATCAATGCATCGCAGCACACAAACTGAC

Xetr9 WT rev3

GCATTTTCATGATACAGTGG

Xetr10 WT for1

TAATACGACTCACTATAGCG

Xetr10 WT for2

GAAATGATGTCAACTAGAGGTTTTTTTTTTCATGCAGCAATTTCTAGGCTCAGTTGTTTC

Xetr10 WT for3

GTTGGTGACCACAATTATGCTGGAATCATAGCAAAATACTACCTGAAATTGGAAAATA

Xetr10 WT rev1

CCTCTAGTTGACATCATTTCCCTTGTAATACGCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr10 G17 rev1

CCTCTAGTTGACATCATTTCCCTTGTCATACGCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr10 WT rev2

CATAATTGTGGTCACCAAGGGAGGACGCATTGCATCCGATGCATCAAAATTGAAACAACTGAGCCT
AGA

Xetr10 WT rev3

TATTTTCCAATTTTCAGGTAGTA

Xetr11 WT for1

TAATACGACTCACTATAGCG

Xetr11 WT for2

GTCTGATAGGGGTAAATTGCTTAATGCTGAGCCTGCACAATTTTGTGTTTGAGCCATGAAGGTCTG

Xetr11 WT for3

GTTATGATTATCTTGAATGTCTTCAACCCTTTCTAGGCTGATTTTCTTTGTTG

Xetr11 WT for4

CAAGCTACAATTTGCTAGTGTAATTGCATCTCAGCACAGATAAAAAGAGAAACCT

Xetr11 WT rev1

CAATTTAACCCTATCAGACATAAATGTTTTGTTTACCTCGCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr11 G17 rev1

CAATTTAACCCTATCAGACATAAATGTTTTGTTTACCTCGCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr11 WT rev2

GAAGACATTCAAGATAATCATAACAACCTAAAGTAGCACATACACAGACCTTCATGGCTCA

Xetr11 WT rev3

CACTAGCAAATTGTAGCTTGGCTACAACAAAGAAAATCAGCCTAG

Xetr11 WT rev4

AGGTTTCTCTTTTATCTGTGC

Xetr12 WT for1

TAATACGACTCACTATAGGG

Xetr12 WT for2

GAACTCACCATTTGATAAATACACTTCTAAAAATCCCATAGAAATGAATAGAACATGG

Xetr12 WT for3

CTTATGTATTAAGCTCTAAAGTCACATTTTGATAAATATGCCCCTATAAGT

Xetr12 WT for4

GAATTTACAGCAGGTAGGCCTTAGGGGAGTGGAGGAACATATATATGAAATAA

Xetr12 WT rev1

GTATTTATCAAATGGTGAGTTCTAACTTTCCCCCATTGATAACCCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr12 G17 rev1

GTATTTATCAAATGGTGAGTTCTAACTTTCCCCCATTGATAACCCTATAGTGAGTCGTATTA

Xetr12 WT rev2

GACTTTAGAGCTTAATACATAAGAACTCACCCATGTTCTATTCAATTTCTATG

Xetr12 WT rev3

GCCTACCTGCTGTAAATTCTTCCCTGTGTGTGTCAGCAGGAAGCTGACTTATAGGGGCATATTTATC

Xetr12 WT rev4

TTATTTTCATATATATGTTCCCTCCAC

Arly2 WT for01

TAATACGACTCACTATAGGC

Arly2 WT for02

CAGTTGCGTTTTCCCATTTGAAATCAAAATGCAGCTTCGATTTGAATGAAAGAAGCTGGAAAATGC

Arly2 WT for03

CAGCGAAGAAGCAAATCGGAGCTGAAGAACTCAAGAAGAGTTGAAATCG

Arly2 WT rev01

CAATGGGAAAACGCAACTGCAAATCGAAGTATCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Arly2 G17 rev01

CAATGGGAAAACGCAACTGCAAATCGAAGCATCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Arly2 WT rev02

CGATTTGCTTCTTCGCTGTTCTCCTATGCATTTTCCAGCTTCTTTC

Arly2 WT rev03

CGATTTCAACTCTTCTTGAG

Arly3 WT for01

TAATACGACTCACTATAGGG

Arly3 WT for02

GAAACCGATCACCTGATGAGCTCAAGGTAGAGCGAAACCAGT

Arly3 WT rev01

CATCAGGTGATCGGTTTCAGATCACGACCAGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Arly3 G17 rev01

CATCAGGTGATCGGTTTCAGATCACGACCAGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Arly3 WT rev02

ACTGGTTTCGCTCTACC

Arly4 WT for01

TAATACGACTCACTATAGGG

Arly4 WT for02

CACTAGATTATGATTATCTTTGGATTAGAAGACAAAATTCTGTCTTCCCGTTTTGAGGGGAAAGTTA
G

Arly4 WT rev01

CCAAAGATAATCATAATCTAGTGAAAAAAAAAATCTAAACTAAGTTAACCTATAGTGAGTCGTAT
TA

Arly4 WT rev02

CTAACTTTCCCCTCAAAAC

Arly5 WT for01

TAATACGACTCACTATAGGC

Arly5 WT for02

CAGTTGCGTTTTCCCATTTGAAATCAAAATTCAGCTTCGATTTGAATGAAAGAAGCTGGAAAATGC

Arly5 WT for03

CAGCGAAGAAGCAAATCGGAGCTGAAGAACTCAAGAAGAGTTGAAATCG

Arly5 WT rev01

CAATGGGAAAACGCAACTGCAAATCGAAGTATCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Arly5 G17 rev01

CAATGGGAAAACGCAACTGCAAATCGAAGCATCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Arly5 WT rev02

CGATTTGCTTCTTCGCTGTTCTCCTATGCATTTTCCAGCTTCTTTC

Arly5 WT rev03

CGATTTCAACTCTTCTTGAG

Ara1 WT for1

TAATACGACTCACTATAGGG

Ara1 WT for2

GAAACCCGATCACCTGATGAGCTCAAGGTAGAGCGAAACCAGT

Ara1 WT rev1

CATCAGGTGATCGGGTTTCAGATCACGACCAGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Ara1 G17 rev1

CATCAGGTGATCGGGTTTCAGATCACCACCAGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Ara1 WT rev2

ACTGGTTTCGCTCTACC

Ara1 L1pC for2

TAATACGACTCACTATAGGGACTGGTCGTGATCCCCCCCCGATCACCTGATGAGCTC

Ara1 L1pC rev1

ACTGGTTTCGCTCTACCTTGAGCTCATCAGGTGATC

Ara1 L2pC for2

GAAACCCGATCACCTGATGAGCTCCCCCCCCGAGCGAAACCAGT

Ara1 L2pC rev1

CATCAGGTGATCGGGTTTCAGATCACGACCAGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Ara1 L2pC rev2

ACTGGTTTCGCTCGGGG

PLMVd WT for1

TAATACGACTCACTATAGCG

PLMVd WT for2

GCTAAGCCCACTGATGAGCCGCTGAAATGCGGCGAAACTTTTGA

PLMVd WT rev1

CATCAGTGGGCTTAGCCCAGACTTTTGACGCTATAGTGAGTCGTATTA

PLMVd G17 rev1

CATCAGTGGGCTTAGCCCACACTTTTGACGCTATAGTGAGTCGTATTA

PLMVd WT rev2

TCAAAAGTTTCGCCGCATTT

PLMVd L1pC for2

GCCCCGCCCACTGATGAGCCGCTGAAATGCGGCGAAACTTTTGA

PLMVd L1pC rev1

CATCAGTGGGCGGGGCCAGACTTTTGACGCTATAGTGAGTCGTATTA

PLMVd L2pC for2

GCTAAGCCCACTGATGAGCCGCCCCCCCCGCGGCGAAACTTTTGA

PLMVd L2pC rev2

TCAAAAGTTTCGCCGCG

PLMVd L1+2pC for1

GCCCCGCCCACTGATGAGCCGCCCCCCCCGCGGCGAAACTTTTGA

PCR auf genomische DNA**Arth1 WT for01**

TAATACGACTCACTATAGGGGTGTACTGTGTTTGTACTTGGATTTATTTG

Arth1 G17 for01

TAATACGACTCACTATAGGGGTGTGCTGTGTTTGTACTTGGATTTATTTG

Arth1 WT rev01

GCGTTTCTAAACATATATCCAGTCATCAACACGC

Arth5 WT for01

TAATACGACTCACTATAGGCACGTAATGTACATATTTATACTAAGATACAGAC

Arth5 G17 for01

TAATACGACTCACTATAGGCACGTTATGTACATATTTATACTAAGATACAGAC

Arth5 WT rev01

ACGTTTCAAGATTGGAGTTCGTCAACTC

Xetr1 gDNA for01

TAATACGACTCACTATAGGGCTCAAGTGTTTTACCTATTTCC

Xetr1 gDNA rev01

ACCGGTTTCGCCCTTC

Xetr2 gDNA for01

TAATACGACTCACTATAGGGGCTGCAACATAATGAACAG

Xetr2 gDNA rev01

CCGGTTTCGCCCTTC

Xetr4 gDNA for01

TAATACGACTCACTATAGGGCAGACCAGTTTCACCCTTC

Xetr4 gDNA for02

GAAGGCAAGCCGGTCTG

Xetr4 gDNA rev01

GCCAGTTTCGCCCTTTTGG

Xetr5 gDNA for01

TAATACGACTCACTATAGGGCTCTCATGTTTATTTCTCTCC

Xetr5 gDNA rev01

TGTGTTTCGTCCTGTTTGG

Xetr7/8 gDNA for01

TAATACGACTCACTATAGGGGGAACACAAGCCCCAAG

Xetr7/8 gDNA rev01

GAAGCCAGGATAATAGCTGATCAG

Herstellung der antisense Sonde

AS Sonde Xetr7/8 for

GGAACACAAGCCCCAAG

AS Sonde Xetr7/8 rev

TAATACGACTCACTATAGGGACCGGTTTCGCCCTTCTTGG

Umklonierung in pGEM[®]-T-Easy und pDneo2a β -Gal

Xetr2 WT for XhoI

CTCGAGCCGGTCTGTAGTTGGGAATC

Xetr2 G17 for XhoI

CTCGAGCCGGTGTGTAGTTGGGAATC

Xetr2 WT rev XhoI

CTCGAGGTCGACCCGGTTTCGCCCTTCTTG

Xetr2 L2pC rev XhoI

CTCGAGGTCGACCCGGTTTCGCCCGGGG

Xetr5 WT for XhoI

CTCGAGTGTGTCTGCAGCTGCCCACGTG

Xetr5 G17 for XhoI

CTCGAGTGTGTGTGCAGCTGCCCACGTG

Xetr5 WT rev XhoI

CTCGAGGTCGACTGTGTTTCGTCCTGTTTGGGAC

Xetr5 L1pC for XhoI

CTCGAGTGTGTCTGCAGCCGCCACGTG

Xetr5 L2pC rev XhoI

CTCGAGGTCGACTGTGTTTCGTCCGGGGGG

Ara1 WT for XhoI

CTCGAGACTGGTCGTGATCTGAAACC

Ara1 G17 for XhoI

CTCGAGACTGGTGGTGTGATCTGAAACC

Ara1 WT rev XhoI

CTCGAGGTCGACACTGGTTTCGCTCTACCTTG

Ara1 L1pC for XhoI

CTCGAGACTGGTCGTGATCCCCC

Ara1 L2pC rev XhoI

CTCGAGGTCGACACTGGTTTCGCTCGGGG

PLMVd WT for XhoI

CTCGAGTCAAAAGTCTGGGCTAAGC

PLMVd G17 for XhoI

CTCGAGTCAAAAGTGTGGGCTAAGC

PLMVd WT rev XhoI

CTCGAGGTCGACTCAAAAGTTTCGCCGCATTTTC

PLMVd L1pC for XhoI

CTCGAGTCAAAAGTCTGGGCCCCGC

PLMVd L2pC rev XhoI

CTCGAGGTCGACTCAAAAGTTTCGCCGCGG

Sequenzierung

T7

TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

SP6

ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC

pJET1 for

GCCTGAACACCATATCCATCC

pJET1 rev

GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC

Seq pDneo2a βGal

GATCTGCCATTGTCAGACATG

Primer Extension Assay

PE pDneo2a β-Gal rev

GTGAACAATTGATGGACGACTCTAG

4.1.10 Vektoren¹

pDneo2a lacZ²

Wiegand, 2012

pGEM[®]-T-Easy

Promega, Mannheim

pJET1/blunt Cloning Vektor

Fermentas, St. Leon-Rot

¹ Entsprechende Vektorkarten sind im Anhang A1 aufgeführt.

² pDneo2a lacZ enthält an Position 3092 eine CTA- und an Position 3094 ein A-Insertion. Die Insertionen wurden im Laufe der Arbeit durch Sequenzierung identifiziert.

4.1.11 Organismen

Escherischia coli DH5a

Invitrogen, Karlsruhe

Dictyostelium discoideum Ax2

Watts und Ashworth, 1970

4.1.12 Größenstandards

GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (#SM0321)	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (#SM0311)	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (#SM1211)	Fermentas, St. Leon-Rot
RiboRuler™ Low Range RNA Ladder (#SM1831)	Fermentas, St. Leon-Rot

4.1.13 Software und Online-Programme

NCBI/ Blast	www.blast.ncbi.nlm.nih.gov
VectorNTI 10.3.1 [©] 2007	Invitrogen, Karlsruhe
Origin [®] 7	OriginLab, Northampton
MultiGauge 3.2	Fujifilm, Deutschland
CLC Sequence Viewer	www.clcbio.com
4Peak	www.mekentosj.com
CorelDRAW [®] X3	www.corel.com
BioMath Calculator	www.promega.com/techserv/
Xenbase	www.xenbase.org
Ensembl	www.ensembl.org
Mfold	www.mfold.rna.albany.edu
Multalin	www.bioinfo.genotoul.fr/multalin

4.2 Zellbiologische Methoden

Teile der Methoden (insbesondere der Umgang mit *Dictyostelium discoideum*) wurden aus der Diplomarbeit von Janis Kruse (Kruse, 2010) übernommen. Die für die Untersuchung der Hammerhead Ribozyme genutzten Methoden wurden im Laufe der Arbeit unter dem Titel, *Characterization of Hammerhead Ribozyme Reactions*, veröffentlicht (Kalweit et al., 2012).

4.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in Schüttelkultur bei 180 rpm und 37°C in LB-Medium oder zur Selektion auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden 0,85 ml *E. coli* Zellen aus Schüttelkultur in 0,15 ml autoklaviertem Glycerin bei -80°C eingefroren.

4.2.2 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen (Hanahan, 1983)

Um eine Vielzahl von Klonen zu erhalten, müssen die in die Vektoren ligierten PCR- bzw. Restriktions-Fragmente in „Vektor-vermehrnde“ Bakterien transformiert werden. Für eine effektive Transformation ist es dabei notwendig, die zu transformierenden Bakterien zuvor so zu behandeln, dass die Fähigkeit zur Aufnahme von Nukleinsäuren deutlich erhöht bzw. artifiziell geschaffen wird. In diesem Fall wurde die sog. Rubidiumchlorid-Methode zur Herstellung solcher transformationskompetenten Zellen angewandt. Dabei wurden Zellen des *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet.

Zuerst wurden 10 ml LB-Amp-Medium mit dem *E. coli*-Stamm angeimpft (Über-Nacht-Kultur, ÜNK). Die Inkubation der Vorkultur erfolgte bei 37°C und ca. 180 rpm ü. N. in einem Schüttler. Am nächsten Tag wurden 95 ml, auf 37°C vorgewärmtes, LB-Amp-Medium mit 5 ml der ÜNK beimpft und bei ca. 180 rpm und 37°C im Thermoschüttler inkubiert, bis eine OD_{595nm} von ca. 0,8 erreicht war. Die Bestimmung der OD erfolgte mittels dem Biophotometer plus der Firma Eppendorf (Hamburg) bei einer Wellenlänge von 595 nm. Danach wurde die Bakterienkultur für 5 min bei 4000 \times g und 4°C pelletiert. Nachdem der Überstand entfernt war, wurde das Pellet in 40 ml (0,4 \times Vol. ausgehend von 100 ml Kultur) eiskaltem TfbI-Puffer resuspendiert und für 10 min im Eisbad inkubiert. Danach schloss sich erneut eine Zentrifugation für 5 min bei 4000 \times g und 4°C an. Der Überstand wurde weitgehend dekantiert und das Pellet in 4 ml (0,04 \times Vol. ausgehend von 100 ml Kultur) eiskaltem TfbII-Puffer resuspendiert, für 20 min im Eisbad inkubiert, in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert (je 100 μ l/Tube) und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bis zum Gebrauch bei –80°C.

4.2.3 Transformation der kompetenten Zellen

Durch Transformation sollten die in die Vektoren ligierten Fragmente in die *E. coli* Zellen transferiert und durch die Bakterien stark vermehrt werden. Dazu wurden jeweils 10 μ l der Ligationsansätze (s. 4.3.16) zu den in –80°C gelagerten und noch gefrorenen kompetenten Zellen (100 μ l) gegeben. Die Transformationsansätze wurden für 20 min auf Eis langsam aufgetaut und danach für 90 s bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach Ablauf der 90 s inkubierten die Ansätze für 2 min auf Eis. Anschließend erfolgte die Zugabe von 900 μ l raumtemperierten LB-Mediums und die Inkubation der Ansätze für ca. 30 min bei 37°C und 150 rpm im Thermoschüttler. Die Selektion der transformierten Zellen erfolgte auf LB-Agar Platten mit entsprechendem Antibiotikum und Inkubation für 12-16 Stunden bei 37°C.

4.2.4 Blau-Weiß Selektion

Durch Selektion auf mit Ampicillin (Amp) versetzten LB-Agar Platten konnten nur Bakterienzellen Kolonien bilden, die während der Transformation die Vektor-DNA aufgenommen und somit das Amp-Resistenzgen erworben hatten. Nach diesem Selektionsschritt sollten nur *E. coli* Zellen mit integrierter Vektor-DNA auf den Platten wachsen. Neben dem Antibiotika Amp wurden dem LB-Agar Platten noch 0,2% (v/v) X-Gal und 0,4% (v/v) IPTG zugegeben. Durch Komplementation des lacZ⁺ DH5 α -Stammes mit der lacZ⁺ Vektor-DNA wird die biologische Aktivität der β -Galaktosidase wieder hergestellt (α -Komplementation). Solche Zellen exprimieren, induziert durch das zugesetzte IPTG (= synthetischer Induktor), eine intakte β -Galaktosidase, die in der Lage ist, das chromogene β -Galaktosidase-Substrat X-Gal umzusetzen. Dabei wird das farblose X-Gal durch die β -Galaktosidase in β -Galaktosid und ein bläuliches Indigoderivat gespalten. Durch Insertion eines DNA-Abschnittes, während der Klonierung des Vektors in dessen MCS, wird unter Umständen das Leseraster (ORF) des lacZ-Gens in der Weise unterbrochen, dass es zu keiner Expression eines intakten α -Peptids kommt. Folglich sind die Zellen nicht mehr zur α -Komplementation befähigt und nicht in der Lage X-Gal umzusetzen. Es ist daher wahrscheinlich, dass durch die Klonierung der Fragmente (s. 4.3.16) in den pGEM[®]-T-Easy Vektor, der ORF des N-terminalen α -Fragments unterbrochen wird. Die Insertion von sehr kleinen Fragmenten (<250bp) muss allerdings nicht zwangsläufig zu einer Destruktion des ORF's der α -UE der β -Galaktosidase führen und daher kann es trotzdem zu einer Blaufärbung der Bakterienkolonien kommen. Zusätzlich zeigte sich, dass dieses Verfahren der Selektion nicht eindeutig ist, da es oft zur Bildung von weißen Kolonien mit blauem Zentrum oder nur blass blauen Kolonien kam. Daher wurden neben weißen Kolonien jeweils auch einige blaue Kolonien der Platten in einer anschließenden Kolonie-PCR (s. 4.3.13) untersucht.

4.2.5 Axenische Kultivierung von *Dictyostelium discoideum*

Die natürliche und essentielle Nahrungsquelle von *D. discoideum* stellen im Boden lebende Bakterien dar. Für eine Kultivierung im Labor sind Bakterien als Medium allerdings ungeeignet, da sie sich störend bei Transformationen, sowie DNA- und RNA-Präparationen auswirken. Derivate des Wildtyp-Stamms NC-4 (Ax2, Ax3, Ax4) sind in der Lage axenisch zu wachsen, wenn auch mit einer verringerten Verdopplungsrate. Die optimalen Kultivierungsbedingungen für *D. discoideum* liegen bei einer Temperatur zwischen 21-23°C, einer Zelldichte von 1×10^4 bis 4×10^6 und konstantem Licht. Die Anzucht kann stationär in

Petrischalen oder schüttelnd bei 150 rpm erfolgen. Zudem ist es notwendig die Zellen alle drei Tage mit frischem Medium zu versorgen, um eine Anreicherung von Stoffwechselprodukten und Nahrungsmangel zu verhindern. Unter optimalen Bedingungen erreicht *D. discoideum* in axenischem Medium eine Verdopplungsrate von 8-12 h.

4.2.6 Herstellung von *Dictyostelium discoideum* Sporen

Um *D. discoideum* dauerhaft lagern zu können, wurden Sporen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Herstellung von Sporen wurden insgesamt 2×10^8 Zellen aus Schüttelkultur bei 390 x g abzentrifugiert und 2 x mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 500 µl Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert und auf Phosphatagar ausplattiert. Innerhalb von 2-4 Tagen bei 22°C entwickelten sich Sporenköpfe, die durch umgedrehtes Aufschlagen auf eine Tischplatte in den Petrischalendeckel abgeklopft, oder mit einer sterilen Impföse abgenommen werden konnten. Die Sporen wurden in insgesamt 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer aufgenommen, in ein Cryoröhrchen überführt und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren.

4.2.7 Transformation von *Dictyostelium discoideum* mittels Elektroporation

Für eine Transformation von *D. discoideum* mit Plasmid-DNA oder linearen DNA-Fragmenten wurden insgesamt 2×10^7 Zellen aus Schüttelkultur bei 390 x g und 4°C abzentrifugiert und 2 x mit Soerensen-Phosphatpuffer und 1 x mit Elektroporationspuffer (EP-Puffer) gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 700 µl eiskaltem EP-Puffer resuspendiert, mit 10-15 µg DNA gemischt und das Volumen mit EP-Puffer auf 800 µl gebracht. Nach 10 min auf Eis erfolgte die Elektroporation bei 1 kV und 25 µF. Die Zellen wurden anschließend zusammen mit 8 µl 100 mM MgCl₂ und 8 µl 100 mM CaCl₂ in einer Petrischale 15-30 min inkubiert, bis sie in 10 ml G0-Medium aufgenommen wurden. Das Medium wurde am nächsten Tag gegen Selektionsmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgetauscht.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren von Proteinen in wässrigen Lösungen abzutrennen, wurde 1 Vol. (mind. 100 µl) Phenol/Chloroform zugegeben und die Lösung geschüttelt bis eine weiße Emulsion entstand. Die obere wässrige Phase wurde anschließend durch Zentrifugation bei 12.000 x g abgetrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um evtl. verbleibende Phenolreste aus

der Lösung zu entfernen wurde eine weitere Extraktion mit Chloroform durchgeführt und die Nukleinsäuren schließlich mit Ethanol entsprechend Abschnitt 4.3.2 gefällt.

4.3.2 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Die Ethanolfällung von Nukleinsäuren ist eine Standardmethode um selbst kleine Mengen von DNA oder RNA aus wässrigen Lösungen zu isolieren. In Anwesenheit von monovalenten Metallionen wie Na^+ oder Li^+ fallen Nukleinsäuren bei Zugabe von Alkohol als Salz aus und lassen sich bei 12.000 x g abzentrifugieren. Die Fällungen wurden, wenn nicht anders angegeben mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat pH 4,7 und 3 Vol. reinst Ethanol mind. 20 min bei -20°C durchgeführt. Ein anschließender Waschschrift mit 70%igem Ethanol sollte überschüssige Salze entfernen, bevor die DNA getrocknet und in UV- H_2O gelöst wurde.

4.3.3 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Zur größenabhängigen Trennung von DNA-Fragmenten diente eine horizontale Agarosegelelektrophorese. In Abhängigkeit von den aufzutrennenden Fragmenten wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8-1,5% eingewogen und in 1 x TBE-Puffer aufgekocht. Zur Färbung der DNA wurde 0,01% (w/v) Ethidiumbromidlösung zur leicht abgekühlten Agarose hinzugegeben. Ethidiumbromid interkaliert zwischen benachbarten Basenpaaren der DNA und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht im sichtbaren Bereich von 540 nm. Nach Erstarren der Agarose wurden die DNA-Proben mit entsprechenden Volumen 6 x DNA-Auftragspuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 6 V/cm Elektrodenabstand in 1 x TBE-Puffer.

4.3.4 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAA-Gelelektrophorese)

Die PAA-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von kleineren Nukleinsäuren, da mit PAA-Gelen im Vergleich zu Agarose-Gelen einen größerer Vernetzungsgrad erzeugt werden kann. Durch Zugabe hoher Konzentrationen von Harnstoff werden denaturierende Bedingungen geschaffen. PAA wird aus einem Gemisch aus Acrylamid und N,N'-Methyldiacrylamid hergestellt. Die Porengröße ist abhängig von der PAA-Konzentration (5-20%) und dem Vernetzungsgrad. Die Auftrennung erfolgt abhängig von der PAA-Konzentration in einem Bereich von 1 bis ca.1000 bp (s. Tab. 4.1) während das Laufverhalten der verwendeten Farbstoffe im 2x RNA-Ladepuffer zeigt wie weit das Gel bereits gelaufen ist (s. Tab. 4.2).

Tabelle 4.1: Auftrennung in Abhängigkeit von der PAA-Konzentration (Green und Sambrook, 2012)

PAA-Gel (%)	Auftrennung (bp)
3,5	100-1000
5	80-500
8	60-400
12	40-200
20	5-100

Tabelle 4.2: Laufverhalten der Farbstoffe in Abhängigkeit von der PAA-Konzentration (Green und Sambrook, 2012)

PAA-Gel (%)	Bromphenolblau (bp)	Xylencyanol (bp)
5	35	130
6	26	106
8	19	75
10	12	55
20	8	28

Je nach gewünschtem Auftrennungsgrad wurden Gele mit unterschiedlichen PAA-Konzentrationen genutzt. Für die Herstellung eines PAA-Gels wurden 60 ml PAA-Stocklösung mit 150 µl APS (20%) und 60 µl TEMED gemischt. Dabei fungiert APS in der Lösung als Radikalstarter und TEMED bewirkt eine explosionsartige Freisetzung der Radikale, welche die Doppelbindungen des Acrylamids und Bisacrylamids angreifen und zur Polymerisation des Gels führen. Die noch flüssige PAA-Lösung wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und nach erfolgter Polymerisation für den Gellauf in eine entsprechende Apparatur eingespannt. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Die Proben wurden entsprechend mit 2x RNA-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert und kurz auf Eis inkubiert. Der Gellauf erfolgte bei konstanten 25 mA für 3-4 h.

4.3.5 Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Reinigung von elektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren aus Agarosegelen wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und über das "GeneJET™ Gel Extraction Kit" der Firma Fermentas gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers.

4.3.6 Isolierung und Reinigung von radioaktiv markierter RNA aus PAA-Gelen

Die Isolierung von radioaktiv markierter RNA aus Polyacrylamid-Gelen erfolgte nach dem Prinzip der Diffusion. Um die aufgetrennten RNA-Fragmente aus einem PAA-Gel auszuschneiden ist es erforderlich das Gel zu markieren. Die Markierung erfolgte mit

2x RNA-Ladepuffer der zuvor mit radioaktivem Material versetzt wurde. Anschließend wurde ein mit BaFBr:Eu-Kristallen beschichteter Screen aufgelegt. Die Elektronen in den Kristallen werden durch ionisierende Energie in einen angeregten, stabilen Zustand ($\text{Eu} \rightarrow \text{Eu}^{2+}$) versetzt. Nach erfolgreicher Exposition wurde der Screen mit einem PhosphorImager ausgewertet. Dabei werden die Kristalle von einem Laserstrahl in einen instabileren Zustand ($\text{Eu}^{2+} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$) überführt und fallen anschließend durch Abgabe von Lichtenergie, die gemessen werden kann, in ihren Grundzustand ($\text{Eu}^{3+} \rightarrow \text{Eu}$) zurück (Johnston et al, 1990). Es wurde ein 1:1 Ausdruck des Bildes gemacht und die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der RNA aus den Gelstücken erfolgte ü.N. unter Schütteln bei Raumtemperatur in 300 µl Elutionspuffer. Zur Reinigung der Transkripte wurden eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Ethanolfällung durchgeführt (s. 4.3.1/4.3.2). Das Pellet wurde in der 20-50 µl UV-H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.3.7 Plasmidminipräparation (nach Birnboim und Doily, 1979)

Um kleinere Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, wurde die Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doily, 1979) verwendet. Für diesen Zweck wurden 1 ml Bakterienkultur 12-16 h in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C schüttelnd inkubiert und anschließend in der Zentrifuge bei 4000 x g geerntet. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lösung I resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA erfolgte dann durch Zugabe von 100 µl Lösung II (SDS, NaOH). Die anschließende Neutralisierung des Lysats erfolgte durch Zugabe von 150 µl Lösung III (Natriumacetat). In diesem Schritt präzipitieren chromosomale DNA und Proteine, die sich 5 min bei 12.000 x g zentrifugieren lassen. Der Überstand wurde anschließend mit 800 µl reinst Ethanol versetzt und die DNA 20 min bei -20°C gefällt. Nach Abzentrifugieren und Waschen der DNA mit 70%igem Ethanol wurde das getrocknete Pellet in 20 µl UV-H₂O gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

4.3.8 Plasmidmaxipräparation (Birnboim, 1983)

Für die Isolation größerer Plasmid-Mengen (ca. 100-500 µg) aus Bakterien wurden 100 ml Bakterienkultur bei 4000 x g 10 min abzentrifugiert und in 4 ml Lösung I resuspendiert. Die Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA sowie anschließende Neutralisierung des Zell-Lysats erfolgte mit 8 ml Lösung II und 6 ml Lösung III. Das DNA- und Proteinpräzipitat wurde anschließend bei 12.000 x g 30 min abzentrifugiert und die renaturierte Plasmid-DNA

mit 0,6 Vol. Isopropanol gefällt. Die pelletierte DNA wurde in 200 µl UV-H₂O gelöst und verbleibende Proteine durch Zugabe von 200 µl 10 M LiCl 20 min bei -20°C gefällt. Nach 5 min Zentrifugation bei 12.000 x g wurde die DNA im Überstand einer Ethanol-fällung unterzogen und schließlich in 100 µl UV-H₂O aufgenommen.

4.3.9 Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

(verändert nach Rogers and Bendich's CTAB based protocol; Plant Mol. Biol. Manual, A6:1-10, 1988)

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* wurde zunächst wenig Blattmaterial mit flüssigem Stickstoff und vorgekühltem Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Anschließend wurden 250 µl 2 x CTAB-Puffer zugesetzt und durch Vortexen kräftig gemischt. Das Gemisch wurde dann bei 65°C für 30 min-2 h im Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 250 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v) und kräftiges Mischen der Proben. Die Lösung wurde anschließend zur Phasentrennung 5 min bei Raumtemperatur und 12.000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit 3x Vol. reinst Ethanol versetzt, gut gemischt und 20 min bei -20°C inkubiert. Im Anschluss wurde die DNA 20 min bei 4°C und 12.000 x g pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und das Pellet anschließend in einem geeigneten Volumen UV-H₂O gelöst.

4.3.10 Isolierung genomischer DNA aus *Xenopus tropicalis*

Für die Isolierung von genomischer DNA aus *Xenopus tropicalis* wurde eine Gewebeprobe unter flüssigen Stickstoff in einer Gewebemühle zermahlen. Anschließend wurden das Material mit 10 Vol (w/v) Lysepuffer versetzt und unter Schütteln 1 h bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 100 µg/ml Proteinase K weitere 3 h bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Nachfolgend wurden die Zelltrümmer 10 min bei 12000 x g abzentrifugiert und der Überstand mit 1 Vol (v/v) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gut gemischt. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 12000 x g wurde der Überstand erneut mit Phenol extrahiert. Die genomischen DNA wurde mit Ethanol gefällt und gewaschen und das Pellet anschließend in einem geeigneten Volumen UV-H₂O gelöst.

4.3.11 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Xenopus tropicalis*

Die RNA-Extraktion erfolgte nach der Trizol-Methode. Dazu wurde ca. 1 g des Materials unter flüssigem Stickstoff in einer Gewebemühle fein zerrieben und anschließend 1 ml Trizol-Reagenz zugegeben. Das Gemisch wurde dann sofort kräftig gemischt, anschließend für

10 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert und 10 min bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 200 µl Chloroform von Proteinen und dem Großteil der genomischen DNA getrennt. Es folgte eine 5 minütige Inkubation bei RT. Nach Zentrifugation für 15 min, 4°C und 12.000 x g wurde die obere wässrige Phase abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die so gefällte RNA wurde dann durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g pelletiert und 2 x mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete RNA-Pellet wurde in 20-50 µl UV-H₂O aufgenommen und 10 min bei 55°C gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die Überprüfung der Qualität und Quantität der RNA-Proben erfolgte durch Konzentrationsbestimmung der RNA und Bestimmung des Quotienten der Extinktion bei 260 nm und 280 nm sowie durch Ethidiumbromid gefärbte, Agarosegele.

4.3.12 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Dictyostelium discoideum* (Chomczynski and Sacchi, 1987)

Für Gesamt-RNA Präparationen aus *D. discoideum* wurden 2 x 10⁷ Zellen bei 390 x g pelletiert und in 1 ml Trizol[®]-Lösung sorgfältig resuspendiert. Das Lysat wurde anschließend 2 x 10 min bei 12000 x g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 1 ml Chloroform von Proteinen und dem Großteil der genomischen DNA getrennt. Die obere wässrige Phase wurde nach 15 min Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C vorsichtig abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die so gefällte RNA 10 min bei 12.000 x g und 4°C abzentrifugiert und 2 x mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete RNA-Pellet wurde in 20-50 µl UV-H₂O aufgenommen und 10 min bei 55°C gelöst. Gelöste RNA wurde bei -20°C aufbewahrt und innerhalb von 4 Wochen verbraucht.

4.3.13 Radioaktive Markierung der Größenstandards

Die Markierung der Marker GeneRuler[™] Ultra Low Range DNA Ladder (#SM1211) und RiboRuler[™] Low Range RNA Ladder (#SM1831) erfolgte mittels T4 PNK und nach dem Protokoll der Firma Fermentas. Für eine effiziente Markierung der Marker war es erforderlich die 5'-Phosphatgruppe zu entfernen um anschließend in der *forward* Reaktion die DNA/RNA mit radioaktiv markierten Phosphat zu rephosphorylieren.

Für die Dephosphorylierung wurden die Marker mit Alkalischer Phosphatase für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch eine anschließende Phenol/Chloroform-Extraktion wurden die Enzyme entfernt und die DNA/RNA mit Ethanol gefällt und in 10 µl UV-H₂O gelöst. Die eigentliche

Markierung erfolgte dann mit der T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK) und radioaktiv markierten Nukleotiden für 30 min bei 37°C. In Tabelle 4.3 und 4.4 sind die Ansätze für eine typische Dephosphorylierung und Markierung wiedergegeben.

Tabelle 4.3: Ansatz für Dephosphorylierung der Marker

Komponente	Volumen/Menge
GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (#SM1211) oder RiboRuler™ Low Range RNA Ladder (#SM1831)	je 8 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor (#E00381)	0,5 µl (20u)
10x Reaktionspuffer für Alkalische Phosphatase	2 µl
FastAP™ Thermosensitive Alkalische Phosphatase(#EF0651)	2 µl (2u)
UV-H ₂ O	ad 20 µl
Reaktionsansatz mischen und 30 min bei 37°C inkubieren	

Tabelle 4.4: Ansatz für Markierung der Marker

Komponente	Volumen/Menge
Dephosphorylierter GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder oder Dephosphorylierter RiboRuler™ Low Range RNA Ladder	1 µl
[γ- ³² P]-ATP (5000Ci/mmol, 20µCi/µl)	5µl (10 pmol)
RiboLock™ RNase Inhibitor (#E00381)	0,25 µl (10u)
10 x Puffer A für <i>forward</i> Reaktion	1 µl
T4 PNK (#EK0031)	1 µl (10u)
UV-H ₂ O	ad 10µl
Reaktionsansatz mischen und 30 min bei 37°C inkubieren	

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 2x RNA Ladepuffer gestoppt und die so markierten Marker bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. (Anhang A2 zeigt die radioaktiv markierten Größenstandards)

4.3.14 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit PNK

Die Markierung von dephosphorylierten DNA-Oligonukleotiden erfolgte am 5'-Ende mit Hilfe von [γ-³²P]-ATP und T4-PNK nach folgendem Reaktionsschema:



Dazu wurden die in Tabelle 4.5 angegebenen Komponenten gemischt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Über eine Sephadex G50 Säule wurden anschließend nicht inkorporierte Nukleotide entfernt und die Qualität des Oligonukleotids durch eine PAA-Gelelektrophorese (s. 4.3.4) überprüft.

Tabelle 4.5: Ansatz für radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Komponente	Volumen
10 x Puffer A für <i>forward</i> Reaktion	5 µl
Oligonukleotid (5 µM)	2 µl
[γ - ³² P]-ATP (5000Ci/mmol, 20µCi/µl)	5 µl
T4 PNK (#EK0031)	1 µl
UV-H ₂ O	ad 50 µl
Reaktionsansatz mischen und kurz zentrifugieren	

4.3.15 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient der spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten einer bekannten Sequenz (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1985). Eine der wichtigsten Komponenten der PCR ist die Polymerase. Die klassische Polymerase ist die aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte *Taq*-Polymerase mit einem Aktivitätsmaximum bei 74°C und einem pH von über 8. Diese Polymerase besitzt neben der *template*-abhängigen Polymeraseaktivität noch eine *template*-unabhängige, die für den Anhang einer zusätzlichen Base (meist Adenosin) am neu synthetisierten Strang verantwortlich ist, so dass die PCR-Produkte effektiv in TA-Vektoren kloniert werden können. Die Syntheserate ist mit ca. 2800 bp/min sehr hoch und die Fehlerrate liegt aufgrund der fehlenden 3'-5'-Exonukleaseaktivität bei 10⁻⁵ pro eingebauter Base was eine schnelle Amplifikation ermöglicht. Hingegen ist die *Pfu*-Polymerase aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* für die Amplifikation mutationsfreier DNA-Produkte besser geeignet. Sie besitzt zusätzlich eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (*proofreading*) und produziert somit auch kein Basenüberhang sondern glatte Enden. Durch dieses Merkmal der Polymerase sinkt die Fehlerrate je eingebauter Base auf 10⁻⁶. Der Nachteil dieser Polymerase ist die verringerte Syntheserate mit ca. 500 bp/min, so dass in der vorliegenden Arbeit Mischungen von *Taq*- und *Pfu*-Polymerasen im Verhältnis 2:1 verwendet wurden. In Tabelle 4.6 ist exemplarisch ein PCR-Ansatz angegeben.

Tabelle 4.6: Exemplarischer PCR-Ansatz

Komponente	Volumen/ Menge
gDNA	100 ng
10 x <i>Taq</i> -Polymerase Puffer (15 mM MgCl ₂)	5 µl
dNTP`s (5 mM je Nukleotid)	2 µl
Primer <i>forward</i> (5 µM)	3 µl
Primer <i>reverse</i> (5 µM)	3 µl
<i>Pfu</i> -/ <i>Taq</i> -Mix (2:1)	1 µl
UV-H ₂ O	ad 50 µl
Reaktionsansatz mischen und kurz zentrifugieren	

Der typische PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von etwa 20-35 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten, der Denaturierung, der Primer-Hybridisierung und der Elongation und beschreibt eine Kettenreaktion in der die Produkte der vorherigen Zyklen als *Template* für den nächsten Zyklus dienen und dadurch eine exponentielle Vervielfältigung der gewünschten DNA ermöglichen. Ein typisches PCR-Programm ist in Tabelle 4.7 angegeben, wobei die *Annealing*-Temperatur und -Zeit, die Elongations-Zeit und die Zyklenzahl in Abhängigkeit der verwendeten DNA, der Schmelztemperatur der Primer und dem zu erwartenden PCR-Produkt variieren können.

Tabelle 4.7: Typisches PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1 Initiale Denaturierung	95°C	2 min	1
2 Denaturierung	95°C	30 sec	
3 Primer- <i>Annealing</i>	45-60°C	30 sec	20-35
4 Elongation	72°C	2 min/ kb	
5 Finale Elongation	72°C	5 min	1

4.3.16 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR eignet sich zur schnellen Analyse der mit Plasmid-DNA transformierten *E. coli*-Klone. Durch Selektion auf mit Ampicillin (Amp) versetzten LB-Platten sollten nur DH5α-Zellen mit integrierter Vektor-DNA wachsen. Somit wurden je 10 Kolonien pro Platte mit einer Pipettenspitze gepickt und damit einerseits 20 µl des entsprechenden PCR-Mastermixes (Tab. 4.8) beimpft und andererseits auf neuen LB_{amp}-Platten ausgestrichen. Tabelle 4.9 zeigt exemplarisch ein Kolonie-PCR-Programm.

Tabelle 4.8: Exemplarischer PCR-Ansatz für eine Kolonie-PCR

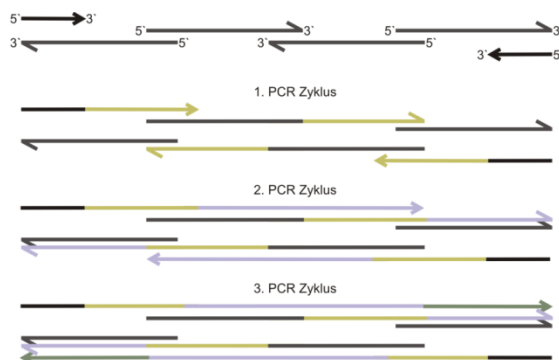
Komponente	Volumen
10 x <i>Taq</i> -Polymerase Puffer (15 mM MgCl ₂)	2 µl
dNTP's (5 mM je Nukleotid)	1 µl
Primer <i>forward</i> (5 µM)	1 µl
Primer <i>reverse</i> (5 µM)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	1 µl
UV-H ₂ O	ad 20 µl
Reaktionsansatz mischen und kurz zentrifugieren	

Tabelle 4.9: Typisches PCR-Programm für eine Kolonie-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1 Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
2 Denaturierung	95°C	30 sec	
3 Primer- <i>Annealing</i>	45-60°C	30 sec	30
4 Elongation	72°C	1 min/kb	
5 Finale Elongation	72°C	5 min	1

4.3.17 Rekursive PCR

Mit der Methode der rekursiven PCR ist es möglich kurze DNA-Sequenzen synthetisch durch sich überlappende DNA-Oligonukleotide herzustellen (Prodromou und Pearl, 1992). Dazu wurde die DNA-Matrize in eine gerade Anzahl sich überlappender Oligonukleotide geteilt, die in den sich überlappenden Bereichen ähnliche Schmelztemperaturen hatten und nicht länger als 50-60 nt waren. Zusätzlich zu diesen Oligonukleotiden waren zwei äußere Oligonukleotide erforderlich, die die eigentliche Sequenz im dritten PCR-Schritt amplifizieren. Abbildung 4.1 zeigt das Prinzip der rekursiven PCR. Die inneren Oligonukleotide lagern sich an den überlappenden Regionen aneinander und werden am freien 3'-OH bis zum nächsten Oligonukleotid verlängert. Im anschließenden PCR-Zyklus werden die inneren Oligonukleotide weiter verlängert und ab dem dritten Zyklus sind ausschließlich die im hohen Überschuss vorhandenen äußeren Oligonukleotide für die Amplifikation der kompletten Sequenz erforderlich.

**Abb. 4.1: Prinzip der rekursiven PCR**

Eine gerade Anzahl sich überlappender DNA-Oligonukleotide (graue Pfeile) mit ähnlichen Schmelztemperaturen in den überlappenden Bereichen lagern sich aneinander. Zusätzlich werden zwei äußere Oligonukleotide (schwarze Pfeile) mit identischer Schmelztemperatur wie die sich überlappenden Bereiche im Überschuss dazugegeben. Im ersten PCR-Zyklus werden die Oligonukleotide entsprechend der Pfeile bis zum nächsten Oligonukleotid verlängert (hellgrün) und im zweiten Zyklus wird der DNA-Strang weiter verlängert (lila). Ab dem dritten Zyklus sind ausschließlich die im hohen Überschuss vorhandenen äußeren Oligonukleotide (grüne Pfeile) für die Amplifikation der kompletten Sequenz erforderlich (grüne Pfeile).

Mittels dieser Methode lassen sich durch die Wahl der geeigneten Oligonukleotide beliebige Mutationen einbauen bzw. zusätzliche Sequenzmuster an die eigentliche DNA-Sequenz anfügen mit denen es möglich ist Klonierungen in spezielle Vektoren durchzuführen. Tabelle 4.10 und 4.11 zeigen ein typisches Protokoll für die Methode der rekursiven PCR.

Tabelle 4.10: Exemplarischer PCR-Ansatz für eine rekursive PCR

Komponente	Volumen
10 x <i>Taq</i> -Polymerase Puffer (15 mM MgCl ₂)	5 µl
dNTP's (5 mM je Nukleotid)	2 µl
Innere Primer (1 µM)	je 1 µl
Äußere Primer (100 µM)	je 1 µl
<i>Pfu</i> -/ <i>Taq</i> -Mix (2:1)	1 µl
UV-H ₂ O	ad 50 µl
Reaktionsansatz mischen und kurz zentrifugieren	

Tabelle 4.11: Typisches PCR-Programm für eine rekursive PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1 Initiale Denaturierung	95°C	30 sec	1
2 Denaturierung	95°C	10 sec	
3 Primer- <i>Annealing</i>	48°C	10 sec	30
4 Elongation	72°C	2 min/ kb	
5 Finale Elongation	72°C	2 min	1

4.3.18 Restriktionsverdau von DNA

Für präparative und analytische Restriktionsspaltungen von DNA wurden bakterielle Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, die direkt an spezifischen Erkennungsstellen, meistens sog. Palindromen, die Phosphodiesterbindungen zwischen den Nukleotiden spalten. Typische Protokolle sind in Tabelle 4.12 und 4.13 wiedergegeben.

Tabelle 4.12: Ansatz für analytische Restriktionsspaltungen

Komponente	Volumen/Menge
DNA	100 ng-1 µg
10 x Puffer	2 µl
Restriktionsenzym	5-10 u
RNase A (2 mg/ml)	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Tabelle 4.13: Ansatz für präparative Restriktionsspaltungen

Komponente	Volumen/Menge
DNA	10-20 µg
10 x Puffer	7,5 µl
Restriktionsenzym	20 u
RNase A (2 mg/ml)	1 µl
UV-H ₂ O	ad 75 µl

4.3.19 Ligation von DNA-Fragmenten

Um möglichst große Mengen, der durch PCR amplifizierten und gereinigten DNA zu erhalten, sollten die Fragmente kloniert werden. Für die Klonierung wurde das pGEM[®]-T-Easy-Vektor System (Promega) bzw. das GeneJET[™] PCR Cloning Kit (Fermentas) verwendet. Diese „Klonierungskits“ eignen sich insbesondere für die Klonierung von PCR-Produkten. Diese Systeme bieten neben dem Klonieren an sich die Möglichkeit einer Selektion durch Antibiotika und im Fall des pGEM[®]-T-Easy Vektor Systems zusätzlich das Blau-Weiß-Screening durch α -Komplementation lacZ-negativer Bakterienstämme. PCR-Produkte, die mit einem *Pfu*/*Taq*-Mix amplifiziert werden, können so direkt mit Hilfe von T4-DNA-Ligase in den Vektor ligiert werden (Reaktionsansatz Tab. 4.14 und 4.15).

Für Umklonierungen in beliebige Vektoren, ist es nötig das DNA-Insert und den Zielvektor mit Restriktionsenzymen zu schneiden, die kompatible Überhänge generieren und die Religation des Vektors zu verhindern, indem die 5'-Enden des Vektors mit Hilfe von FastAP[™] Thermosensitiver Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert wurden. Die Ligation wurde wie in Tabelle 4.16 dargestellt, 12-18 Stunden bei 16°C durchgeführt.

Tabelle 4.14: pGEM[®]-T Easy Ligationsansatz

Komponente	Volumen
pGEM [®] -T Easy (50 ng/μl, Promega)	0,5 μl
PCR-Produkt*	2 μl
2 x Ligationspuffer	5 μl
T4 DNA-Ligase	1 μl
UV-H ₂ O	ad 10 μl

Ligation 1-2 h bei RT

*Die eingesetzte Menge des PCR-Produkts wurde je nach Ausbeute in der PCR variiert.

Tabelle 4.15: pJET1 blunt Ligationsansatz

Komponente	Volumen
pJET1 blunt (50 ng/μl, Fermentas)	1 μl
PCR-Produkt*	2 μl
2 x Ligationspuffer	10 μl
T4 DNA-Ligase	1 μl
UV-H ₂ O	ad 20 μl

Ligation 15 min bei RT

*Die eingesetzte Menge des PCR-Produkts wurde je nach Ausbeute in der PCR variiert.

Tabelle 4.16: Ligationsansatz für Umklonierungen

Komponente	Volumen
Vektor (50 ng/μl)	0,5 μl
Insert (50 ng/μl)	1,5 μl
2 x Ligationspuffer	2,5 μl
T4 DNA-Ligase	1 μl
UV-H ₂ O	-
Ligation 12-18 h bei 16°C	

Nachfolgend wurde jeweils der gesamte Ligationsansatz in transformations-kompetente *E.coli* Zellen transformiert (s. 4.2.3).

4.3.20 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription eignet sich zur Herstellung radioaktiv markierter RNA-Moleküle von einer DNA-Matrize. Hierfür wurde im Vorfeld die gewünschte DNA in einen Vektor mit RNA-Polymerase-Bindungsstelle kloniert bzw. wurde die T7-Promotorsequenz direkt vor die DNA-Sequenz gehängt und in Vektoren ohne Bindungsstelle kloniert. Vor der Transkription wurde das Plasmid mit den entsprechenden Restriktionsenzymen direkt am 3'-Ende der gewünschten Sequenz linearisiert. Dadurch kann in der Transkription eine RNA von

definierter Länge synthetisiert werden. Nach Aufreinigung der linearisierten DNA wurde diese für die *in vitro* Transkription eingesetzt (s. Tab. 4.17). Die *in vitro* Transkription erfolgte für 10 min bei 37°C. Im Anschluss wurden die Transkripte mit Phenol/ Chloroform extrahiert, über eine Sephadex G-50 Säule von den nicht inkorporierten Nukleotiden getrennt und ü. N. einer Ethanol-fällung unterzogen. Die Proben wurden anschließend auf einem PAA-Gel aufgetragen, analysiert und aufgereinigt (s. 4.3.4).

Tabelle 4.17: Reaktionsansatz für radioaktive *in vitro* Transkription

Komponente	Volumen/Menge
linearisierte DNA	200 ng
10x Transkriptionspuffer	5 µl
rATP, rCTP, rGTP (je 5 mM)	5 µl
rUTP (1 mM)	5 µl
[$\alpha^{32}\text{P}$] UTP (3000 Ci/mmol, 10µCi/µl)	1 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor	1 µl
T7 RNA Polymerase	1 µl
UV-H ₂ O	ad 50 µl
Reaktionsansatz mischen und kurz zentrifugieren	

4.3.21 Kinetische Analyse der Spaltungsreaktion der HHRz

Durch Zugabe von Mg^{2+} kann die Spaltungsaktivität der HHRz in Abhängigkeit von der Zeit analysiert werden. Dafür wurde die nicht spaltende RNA aus der *in vitro* Transkription geleluert und unter definierten Reaktionsbedingungen kinetisch analysiert. Das getrocknete RNA-Pellet aus der Ethanol-fällung wurde in 45 µl Spaltungspuffer gelöst, für 2 min bei 80°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach wurden 5 µl als 0-Probe entnommen und in 2x RNA-Ladepuffer überführt. Die eigentliche Spaltungsreaktion fand bei 37°C statt und wurde durch Zugabe von MgCl_2 (Endkonzentration 2 mM) gestartet. Im Anschluss wurden zu sieben verschiedenen Zeitpunkten 5 µl entnommen und die Reaktion durch einen Überschuss an EDTA im 2x RNA-Ladepuffer gestoppt. Die acht Proben wurden dann 5 min bei 95°C denaturiert und auf einem PAA-Gel der entsprechenden Konzentration aufgetrennt. Die Spaltungsreaktionen wurden mittels eines PhosphorImagers analysiert und die kinetische Auswertung erfolgte mit den Programmen Multi Gauge 3.2 und Origin®7. Dabei wurden die Intensitäten der Banden pro Zeitpunkt durch Integration bestimmt und miteinander verglichen. Die gespaltene Fraktion $F(t)$ wurde für jeden Zeitpunkt aus der Intensität des

1. Spaltprodukts (P1) und des 2. Spaltprodukts (P2) durch die Intensität der Spaltprodukte und des ungespaltenen Produkts (*full lenght*, FL) entsprechend der Gleichung 1 berechnet.

$$F(t) = \frac{P1+P2}{P1+P2+FL} \quad (1)$$

F(t) wurde dann gegen die Zeit aufgetragen und die kinetischen Parameter über Regression entsprechend Gleichung 2 bestimmt.

$$F(t) = F_0 + F_\infty (1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

Dabei ist F_0 die gespaltene Fraktion zum Zeitpunkt 0 und F_∞ die gespaltene Fraktion am Ende der Reaktion und k ist die Spaltkonstante (k_{obs}). Der k_{obs} Wert wird in min^{-1} angegeben und ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Reaktion (Stage-Zimmermann und Uhlenbeck, 1998).

4.3.22 Analyse der Ligationsreaktion der HHRz

Durch Zugabe von Mg^{2+} kann auch die Ligationsreaktion der HHRz in Abhängigkeit von der Zeit analysiert werden. Dafür wurden die beiden Spaltprodukte der HHRz aus der *in vitro* Transkription geleluert und eine Ethanol-fällung durchgeführt. Die getrockneten RNA-Pellets aus der Ethanol-fällung wurde in je 15 μl Spaltungspuffer gelöst, für 2 min bei 80°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach wurden die beiden Proben der Spaltprodukte vereinigt, 10 μl als 0-Probe entnommen und in 2x RNA-Ladepuffer überführt. Die eigentliche Ligationsreaktion fand bei 37°C statt und wurde durch Zugabe von MgCl_2 (Endkonzentration 2 mM) gestartet. Nach 30 min wurde erneut 10 μl entnommen und die Reaktion durch einen Überschuss an EDTA im 2x RNA-Ladepuffer gestoppt. Die Proben wurden dann 5 min bei 95°C denaturiert und auf einem PAA-Gel der entsprechenden Konzentration aufgetrennt. Die Ligationsreaktionen wurden mittels eines PhosphorImagers analysiert.

4.3.23 Primer Extension Assay

Eine weitere Methode zur Überprüfung der Aktivität der HHRz stellt, neben dem ONPG Assay (s. 4.4.1), die Primer Extension dar. Dafür wurde Gesamt-RNA aus den entsprechenden *D. discoideum*-Stämmen isoliert und ein DNA-Oligonukleotid mittels $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ endständig markiert. Die Primer Extension erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde die RNA mit dem radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotid hybridisiert (s. Tab. 4.18) und in einem weiteren Schritt das Oligonukleotid mittels reverser Transkriptase am 3'-Ende verlängert (s. Tab. 4.19).

Tabelle 4.18: Hybridisierungsansatz für Primer Extension Assay

Komponente	Volumen/ Menge
Gesamt-RNA	4-8 µg
markiertes Oligonukleotid	6 µl
10 x RT-MgCl ₂ Puffer	1 µl
UV-H ₂ O	ad 10 µl
Denaturierung 1 min bei 95°C und Hybridisierung 4 min bei 54°C.	

Tabelle 4.19: Ansatz für Primer Extension

Komponente	Volumen/ Menge
RVT-Mix (1 u/µl Maxima, 1 x RT-MgCl ₂ Puffer)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
dNTP's (5 mM je Nukleotid)	5 µl
Hybridisierungsansatz	10 µl
Inkubation für 60 min bei 50°C.	

Im Anschluss wurde die reverse Transkriptase für 5 min bei 85°C inaktiviert und die cDNA mit Ethanol präzipitiert. Die Primer Extension Produkte wurden auf ein denaturierendes PAA-Gel aufgetragen und mittels eines PhosphorImagers analysiert.

4.3.24 S1 Nuklease Protektionassay

Der S1 Nuklease Protektionassay dient *ex vivo* dem Nachweis der Expression einer spezifischen RNA in Gesamt-RNA. Zur Quantifizierung der RNA-Spezies wurde als Sonde ein radioaktiv markiertes *in vitro* Transkript hergestellt, dessen Sequenz komplementär zu einem Abschnitt der Ziel-RNA ist. Das Enzym S1-Nuklease kann unter den gewählten Reaktionsbedingungen sowohl einzelsträngige RNA als auch DNA abbauen, somit bleiben nach der Nuklease-Behandlung die entstandenen Hybridstrukturen aus der Sonde und dem komplementären Sequenzabschnitt der mRNA erhalten.

Die radioaktiv markierte *antisense* Sonde der spezifischen RNA wurde mittels *in vitro* Transkription (s. 4.3.20) hergestellt, aus dem Gel aufgereinigt (s. 4.3.6) und in 10 µl Hybridisierungspuffer gelöst. Die Gesamt-RNA wurde mit DNaseI behandelt und anschließend mit der antisense Sonde ü.N. bei 60°C hybridisiert. In Tabelle 4.20 und 4.21 sind die Reaktionsansätze für den DNaseI-Verdau der Gesamt-RNA und der Hybridisierung mit der Sonde wiedergegeben.

Tabelle 4.20: DNase-Verdau der Gesamt-RNA

Komponente	Volumen/ Menge
10 x DNaseI Puffer	2 µl
DNaseI (RNase frei, 1 u/µl)	2 µl
Gesamt-RNA	2 ng
UV-H ₂ O	ad 20 µl
Inkubation für 30 min bei 37°C und Inaktivierung für 10 min bei 65°C.	

Tabelle 4.21: Hybridisierungsansatz für S1 Protektion Assay

Komponente	Volumen/ Menge
Hybridisierungspuffer	22 µl
DNaseI verdaute RNA	5 µl
<i>antisense</i> Sonde	3 µl
Inkubation für 5 min bei 95°C und anschließend ü.N. bei 60°C.	

Die S1-Nuklease Behandlung wurde wie in Tabelle 4.22 dargestellt 1 h bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die Proben phenolisiert und ü. N. einer Ethanolfällung unterzogen. Die gefällten Produkte wurden auf ein denaturierendes PAA-Gel aufgetragen und mittels PhosphorImagers analysiert.

Tabelle 4.22: S1 Protektion Assay

Komponente	Volumen/ Menge
Hybridisierungsansatz	30 µl
5 x S1 Nuklease Puffer	60 µl
S1 Nuklease (100 u/µl)	4 µl
UV-H ₂ O	ad 300 µl
Inkubation für 1 h bei 37°C.	

4.3.25 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte nach der *Extended-HotShot*-Methode der Firma SeqLab aus Göttingen und ist eine Fluoreszenz-Farbstoff-basierte Sequenzierung. Sie bietet die Möglichkeit ca. 1000 bp zu sequenzieren. Dafür wurden 600-700 ng Plasmid-DNA und 20 pmol des entsprechenden Oligonukleotids in einem Volumen von 7 µl eingeschickt. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit den Programmen CLC Sequence Viewer 6 (www.clcbio.com) und 4Peaks (www.mekentosj.com).

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 *In vivo* Analysen der HHRz mittels ONPG Assay

Zur Überprüfung der Aktivität der HHRz *in vivo* wurden diese zunächst in einen lacZ Expressionsvektor (Wiegand, 2012) kloniert und dieser in *D. discoideum* transformiert. Das Gen für β -Galaktosidase wird von einem für *D. discoideum* spezifischen Promotor gelesen und enthält zwischen dem Stop-Codon und dem PolyA-Signal die HHRz Sequenzen. Die Expression des lacZ Gens in diesen Stämmen kann durch den enzymatischen Nachweis der β -Galaktosidase Aktivität mittels ONPG Assay analysiert werden. Dabei wird das Substrat ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid) durch die β -Galaktosidase zu Galaktose und den lichtabsorbierenden Farbstoff o-Nitrophenol hydrolysiert, welcher photometrisch quantifiziert werden kann (Dingermann et al., 1989).

Für den ONPG Assay wurden 2×10^6 *D. discoideum* Zellen aus einer Schüttelkultur entnommen, bei 400 x g und 4°C für 3 min pelletiert und anschließend zweimal mit je 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurde das Pellet in 200 μ l Lysepuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 5 μ l des Zelllysats, 200 μ l ONPG-Lösung und 800 μ l Z-Puffer in eine Küvette vermischt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die β -Galaktosidase-Aktivität bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mit Roti[®]-Quant nach Angaben des Herstellers im Bradford Assay (Bradford, 1976) bestimmt. Zur quantitativen Analyse wurde die Enzymaktivität nach Gleichung 3 berechnet. Diese definiert die Gesamtproteinmenge, welche nötig ist, um 1 nmol ONPG/min zu hydrolysieren.

U	β -Galaktosidase Aktivität [nmol x min ⁻¹ x μ g ⁻¹]
ΔE_{405}	Steigung der Absorption [min ⁻¹]
V_{total}	Reaktionsvolumen [ml]
$V_{Protein}$	Zelllysatmenge in der Reaktion [ml]
$c_{Protein}$	Proteinkonzentration des Zelllysats [mg x ml ⁻¹]
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
ε	molarer Extinktionskoeffizient [4,5 mg x μ mol ⁻¹ x cm ⁻¹]

$$U = \frac{\Delta E_{405} \times V_{total}}{V_{Protein} \times c_{Protein} \times d \times \varepsilon} \quad (3)$$

5. Ergebnisse

5.1 Identifizierung von aktiven Typ III Hammerhead Ribozymen

In Zusammenarbeit mit Carsten Seehafer (Seehafer, 2012) konnten in einer genomweiten Datenbanksuche mit Hilfe eines spezifischen Deskriptors (s. Abb. 2.7) 623609 potentielle Typ III Hammerhead Ribozyme in 172 Eukaryoten, 611 Bakterien, 4 Archaeen und 1373 Viren identifiziert werden (s. Abb. 5.1 A). 96,4% der Treffer stammen aus Eukaryoten, 3,2% aus Bakterien, 0,05% aus Archaeen und 0,35% aus Viren (s. Abb. 5.1 B, wobei Viroide den Viren zugeordnet wurden).

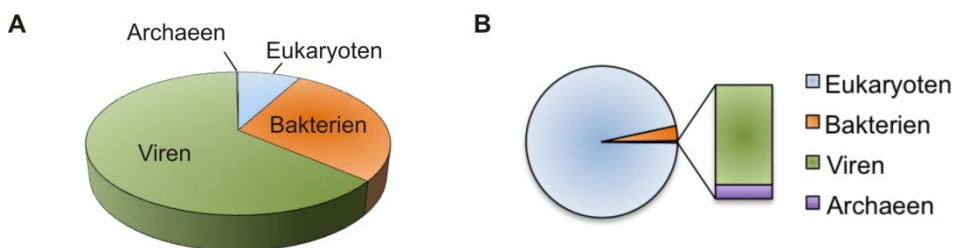


Abb. 5.1: potentielle Typ III Hammerhead Ribozyme

A Das Diagramm zeigt die Anzahl der durchsuchten Organismen pro Gruppe und **B** die Menge der gefundenen primären Treffer pro Gruppe.

Basierend auf der Sekundärstruktur und thermodynamischen Parametern konnten mit Hilfe eines Analyseprogramms (s. Abschnitt 2.5.1) 40112 potentiell katalytisch aktive HHRz aus der Vielzahl der ca. 620000 primären Treffer gefiltert werden. In der vorliegenden Arbeit sollten anhand von experimentellen Analysen die Filterschritte optimiert und somit neue katalytisch aktive HHRz identifiziert werden.

5.1.1 Experimentelle Analyse ausgewählter Treffer

Zur Optimierung der Filterschritte wurden verschiedene primäre Treffer, welche die zuvor bestimmten Parameter erfüllten bzw. in mind. einem Kriterium eine Übereinstimmung zeigten, aus *Xenopus tropicalis*, *Arabidopsis thaliana* und *Arabidopsis lyrata* ausgewählt (s. Tabelle 5.1) und experimentell auf ihre katalytische Aktivität hin untersucht.

Tab. 5.1: Ausgewählte primäre HHRz Treffer zur Optimierung der Filterschritte

Ribozym	$\Delta G^0_{37^\circ\text{C, free}}$ (kcal/mol)	$\Delta G^0_{37^\circ\text{C, motif}}$ (kcal/mol)	$\Delta\Delta G^0 = \Delta G^0_{37^\circ\text{C, motif}} - \Delta G^0_{37^\circ\text{C, free}}$ (kcal/mol)
Xetr1	-30,43	-30,43	0
Xetr2	-47,13	-47,13	0
Xetr3	-18,80	-17,63	1,17
Xetr4	-32,06	-32,06	0
Xetr5	-36,33	-36,33	0
Xetr6	-13,60	-13,38	0,22
Xetr7	-27,83	-27,83	0
Xetr8	-29,53	-29,53	0
Xetr9	-45,7	-38,83	6,87
Xetr10	-31,8	-26,33	5,47
Xetr11	-42,96	-31,46	11,5
Xetr12	-45,08	-37,43	7,65
Ara1	-18,63	-18,63	0
Arly2	-37,08	-37,08	0
Arly3	-18,33	-18,33	0
Arly4	-15,65	-15,53	0,12
Arly5	-39,08	-39,08	0
Arth1	-21,53	-21,53	0
Arth5	-20,09	-19,52	0,57

Die Untersuchung der katalytischen Aktivität erfolgte *in vitro* anhand von Spaltungsanalysen. Zunächst wurden die doppelsträngigen DNA Matrizen der einzelnen Ribozyme synthetisch mittels überlappender Oligonukleotide in einer rekursiven PCR hergestellt (s. 4.3.17). Um die DNA Matrizen in einer späteren *in vitro* Transkription einzusetzen, sollte am 5'-Ende der Ribozymsequenz die T7 RNA Polymerase Promotor Sequenz (TAATACGACTCACTATA) gefolgt von einem Basentriplett (GGG, GGC oder GCG) vorhanden sein (s. Abb. 5.2 A). Das Basentriplett ermöglicht eine Erhöhung der Transkriptionsrate und sollte so gewählt werden, dass sich die Sekundärstruktur der resultierenden RNA nicht verändert. Die Sekundärstruktur wurde mit Hilfe des Programms Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>; Zuker, 2003) analysiert und ist in Abbildung 5.2 am Beispiel von Xetr5 gezeigt (die Faltungsanalysen der anderen oben aufgeführten HHRz sind im Anhang A3 dargestellt). Abbildung 5.2 B zeigt die natürliche Faltung von Xetr5 in ein Hammerhead Ribozym und in Abbildung 5.2 C und D ist die resultierende Sekundärstruktur der RNA nach Anhang eines Basentriplets dargestellt. Der Anhang des Basentriplets GGG bewirkt eine Veränderung der ursprünglichen Sekundärstruktur des Hammerhead-Ribozyms (Abb.5.2 C), dessen katalytische Aktivität experimentell nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Daten nicht

gezeigt). Hingegen bleibt die ursprüngliche Faltung (Abb.5.2 D) und katalytische Aktivität erhalten, wenn das Basentriplett GGC direkt vor dem HHRz angehängt wird (Daten im Anhang A4).

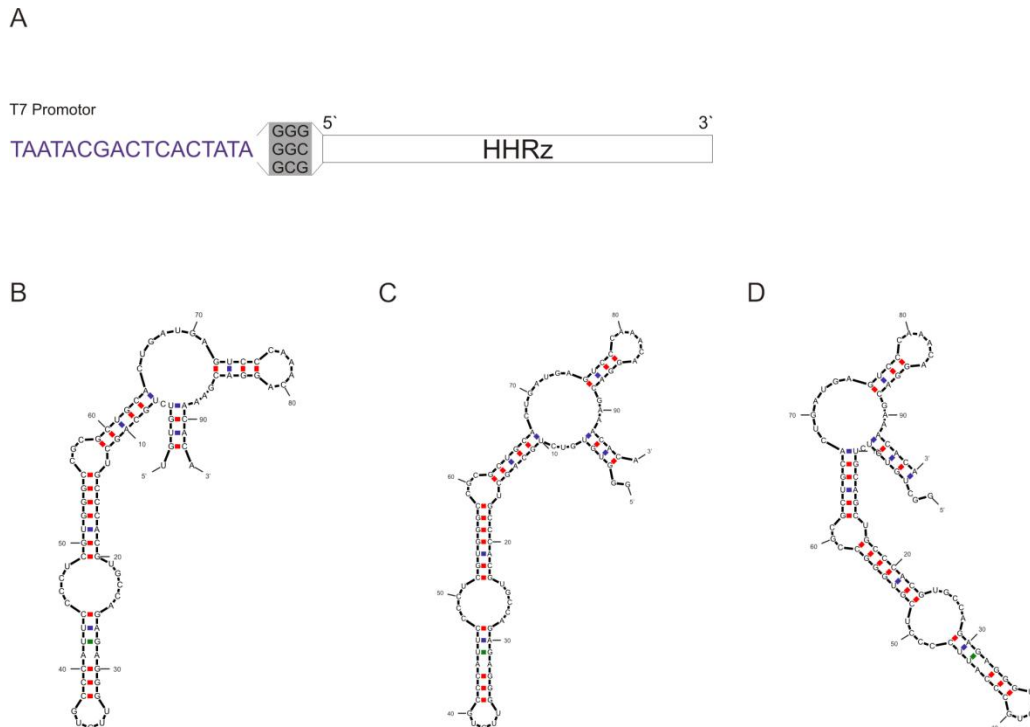


Abbildung 5.2: Entwurf der DNA Matrize für *in vitro* Transkription

A Am 5'-Ende der HHRz Sequenz wurde die T7 Promotorsequenz (lila) gefolgt von einem Basentriplett angehängt. **B-D** Resultierende Sekundärstruktur der RNA am Beispiel von Xetr5, die mit Hilfe des Programms Mfold analysiert wurden. **B** zeigt die Sekundärstruktur der freien Faltung ohne Anhang eines Basentriplets und **C-D** die Sekundärstruktur nach Anhang eines Basentriplets: GGG (C) und GGC (D).

Die mittels rekursiver PCR hergestellten bzw. auf genomischer DNA amplifizierten HHRz-Motive wurden in den pJET1/blunt Vektor kloniert und in kompetente DH5α *E.coli*-Zellen transformiert. Anschließend wurden jeweils 10 Klone mittels Kolonie-PCR analysiert und je ein potentiell positiver Klon sequenziert (aufgrund der großen Umfangs sind die Daten nicht gezeigt). Zeigten die Sequenzierungen der HHRz die richtige Sequenz erfolgte eine Plasmid-Maxipräparation und anschließend zur Linearisierung des Plasmids eine Restriktionsspaltung mit *XhoI* oder *XbaI*, je nach Orientierung des HHRz im Plasmid. Die Untersuchung der katalytischen Aktivität der einzelnen HHRz erfolgte mittels radioaktiver *in vitro* Transkription. Dafür wurden jeweils 200 ng des linearisierten Plasmids mit dem unter 4.3.20 angegebenen Komponenten gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Zusätzlich zu den Wildtyp-Sequenzen der HHRz wurde als interner Größenstandard die G17 Mutante für jedes Motiv mit transkribiert. Theoretisch sollte die Spaltstelle der G17 Mutante blockiert sein und ausschließlich das *full lenght* Transkript entstehen. Abbildung 5.3 zeigt am Beispiel von Xetr1 und Xetr9 die Ergebnisse der *in vitro* Transkription.

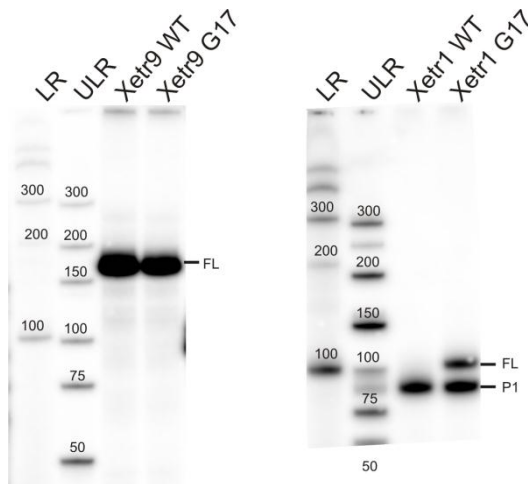


Abb.5.3:Radioaktive *in vitro* Transkription

Analyse der katalytischen Aktivität der *in vitro* Transkripte von Xetr9 (links) und Xetr1 (rechts) auf einem 15%igen denaturierenden PAA-Gel. FL steht für das *full lenght* Transkript und P1 für eines der beiden Spaltprodukte, wobei das kleinere Spaltprodukt aufgrund seiner Größe aus dem Gel gelaufen ist. Die erwarteten Fragmente für Xetr9 waren 156 nt (FL), 148 nt (P1), 8 nt (P2) und für Xetr1 98 nt (FL), 88 nt (P1), 10 nt (P2). Als Größenstandards dienten die zuvor radioaktiv markierten Marker: GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (ULR) und RiboRuler™ Low Range RNA Ladder (LR), sowie die G17 Mutante als interne Kontrolle.

Wie aus Abbildung 5.3 deutlich wird konnte für Xetr9 WT und Xetr9 G17, bei einer MgCl_2 -Konzentration von 5 mM im Transkriptionspuffer, keine katalytische Aktivität nachgewiesen werden. Es entsteht ausschließlich das *full lenght* Transkript mit einer erwarteten Größe von 156 nt. Hingegen zeigt sich bei Xetr1 WT eine deutliche Aktivität während der *in vitro* Transkription, da bereits nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C das komplette *full lenght* Transkript in die beiden Spaltprodukte zerfallen ist. Das zweite Spaltprodukt ist aufgrund seiner geringen Größe von nur 10 nt und zur besseren Auftrennung der größeren Produkte (FL=98 nt, P1=88 nt) bereits aus dem Gel gelaufen. Entgegen aller Erwartungen ist auch bei der Xetr1 G17 Mutante, welche als interne Kontrolle dienen sollte, eine katalytische Aktivität zu beobachten. Da bei Xetr1 WT bereits das gesamte Transkript in die Spaltprodukte zerfallen ist wurde die *in vitro* Transkription in den folgenden Experimenten optimiert und nur noch 10 min bei 37°C inkubiert. Somit konnte für alle oben aufgeführten HHRz ein *full lenght* Transkript erhalten und in gerichteten Spaltungsexperimenten weiter analysiert werden. Dazu wurde das ungespaltene Transkript ü.N. aus dem PAA-Gel eluiert, aufgereinigt und in Spaltungspuffer gelöst. Nach Entnahme einer Nullprobe wurden die Proben in einer kontrollierten Spaltung mit 2 mM MgCl_2 bei 37°C inkubiert und anschließend auf einem 15%igen PAA-Gel analysiert (s. 4.3.21 und 4.3.4). Für eine quantitative Auswertung der katalytischen Aktivität der HHRz wurde eine kinetische Analyse durchgeführt. Mittels den Programmen Multigauge und Origin konnten die Daten visualisiert und wie unter 4.3.21 beschrieben ausgewertet werden.

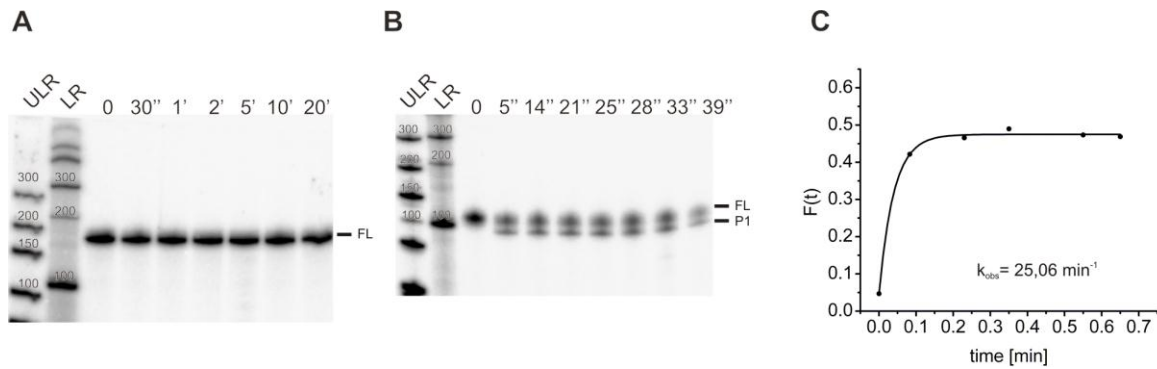


Abb. 5.4: Spaltungskinetiken der Wildtypsequenzen

A-B PAA-Gelanalyse der Spaltungsreaktion der WT-Sequenzen Xetr9 (A) und Xetr1 (B) bei 2 mM MgCl_2 in Abhängigkeit von der Zeit. Die Visualisierung erfolgte nach einer Exposition von 18-24h mittels eines PhosphorImagers. Als Größenstandard dienten die radioaktiv markierten Marker: GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (ULR) und RiboRuler™ Low Range RNA Ladder (LR).

C Auswertung der Spaltungskinetik von Xetr1. Die gespaltene Fraktion $F(t)$ wird für jeden Zeitpunkt aus der Intensität der beiden Spaltprodukte durch die Intensität der Spaltprodukte und der *full length* Transkripte errechnet, gegen die Zeit aufgetragen und durch Regression die kinetischen Parameter nach der Gleichung $F(t) = F_0 + F_\infty(1 - e^{-kt})$ bestimmt. F_0 ist die gespaltene Fraktion am Zeitpunkt 0 und F_∞ am Endpunkt der Reaktion, k ist die Spaltkonstante (k_{obs}) in min^{-1} (Stage-Zimmermann und Uhlenbeck, 1998) und beträgt für Xetr1 $25,06 \text{ min}^{-1}$.

Abbildung 5.4 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der katalytischen Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit von Xetr9 (Abb.5.4 A) für ein nicht aktives und Xetr1 (Abb.5.4 B-C) für ein katalytisch aktives Ribozym. Xetr9 zeigte auch nach einer 20 minütigen Inkubation mit 2 mM MgCl_2 keinen Zerfall des *full length* Transkriptes (156 nt) in die beiden Spaltprodukte (148 nt und 8 nt) und somit keine Aktivität. Hingegen war bei Xetr1 eine deutliche Aktivität zu beobachten, da bereits nach 5 s das *full length* Transkript gespalten wurde. Anhand von Xetr1 konnte für jeden Zeitpunkt die gespaltene Fraktion nach Gleichung 1 (s. 4.3.21) berechnet, gegen die Zeit aufgetragen und über Regression der k_{obs} Wert ermittelt werden (Abb.5.4 C). Der k_{obs} Wert ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Reaktion und wird in min^{-1} angegeben (Stage-Zimmermann und Uhlenbeck, 1998) und beträgt für Xetr1 $25,06 \text{ min}^{-1}$.

Alle in Tabelle 5.1 aufgeführten Typ III HHRz wurden *in vitro*, mittels Transkription und Spaltungsexperimenten, auf ihre katalytische Aktivität hin untersucht. Aufgrund der großen Datenmenge sind die Ergebnisse hier nicht im Einzelnen gezeigt und werden im Anhang A4 aufgeführt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse sowie strukturelle und thermodynamische Besonderheiten der analysierten Ribozyme sind in Tabelle 5.2 dargestellt.

Tab. 5.2: Zusammenfassung der *in vitro* Ergebnisse bzw. strukturelle und thermodynamische Besonderheiten der 19 analysierten Typ III Hammerhead Ribozyme

Ribozym	k_{obs} (min^{-1})	$\Delta\Delta G^0$ (kcal/mol)	$N_{17}N_3$	HHRz Struktur	Wobble Basenpaar
Xetr1	25,06	0	CC	+	-
Xetr2	0,18	0	CC	+	-
Xetr3	nicht aktiv	1,17	CC	-	+
Xetr4	4,32/ 0,14	0	CC	+	-
Xetr5	0,074	0	CC	+	-
Xetr6	nicht aktiv	0,22	UC	+	+
Xetr7	0,19	0	CC	+	-
Xetr8	0,28	0	CC	+	-
Xetr9	nicht aktiv	6,87	AU	-	-
Xetr10	nicht aktiv	5,47	AG	-	-
Xetr11	nicht aktiv	11,5	AA	-	-
Xetr12	nicht aktiv	7,65	CU	-	-
Ara1	2,72	0	CC	+	-
Arly2	nicht aktiv	0	AC	+	+
Arly3	1,89	0	CC	+	-
Arly4	nicht aktiv	0,12	UA	+	+
Arly5	nicht aktiv	0	AC	+	+
Arth1	nicht aktiv	0	AC	+	+
Arth5	nicht aktiv	0,57	AA	+	+

Wie aus Tabelle 5.2 hervor geht, zeigten die 8 schwarz markierten der insgesamt 19 analysierten HHRz in Abhängigkeit von der Zeit eine katalytische Aktivität. Auffällig dabei ist, dass alle 8 HHRz einen $\Delta\Delta G^0$ -Wert von 0 aufweisen, an Position 17 und 3 in der Core-Region jeweils ein C besitzen, in der freien Faltung die typische HHRz-Sekundärstruktur (HHRz Struktur) ausbilden und in den Helix-Regionen I und II kein Wobble-Basenpaar (U-G oder G-U) aufweisen. Für die anderen 11 rot markierten nicht aktiven HHRz konnten in mindestens einem dieser Kriterien keine Übereinstimmungen gefunden werden. Das wichtigste Kriterium, wie an Beispiel Xetr5 in Abbildung 5.2 gezeigt werden konnte, ist die freie Faltung in die typische HHRz Struktur. Das konnte auch bei 6 der 11 nicht aktiven HHRz beobachtet werden, jedoch zeigten alle zusätzliche Wobble-Basenpaarungen in der Helix I und II (s. Sekundärstruktur im Anhang A3). Die 5 analysierten Treffer die nicht die HHRz Struktur ausbildeten, zeigten auch einen erhöhten $\Delta\Delta G^0$ -Wert von > 0 .

5.1.2 Anpassung der Filterschritte

Anhand der oben aufgeführten Experimente und Ergebnisse konnten die Filterschritte wie folgt angepasst werden: Der $\Delta\Delta G^0$ -Wert sollte ≤ 0 sein, die freie Faltung sollte die typische HHRz Sekundärstruktur (HHRz Struktur) ausbilden und die Helix-Regionen I und II sollten keine Wobble-Basenpaarung (U-G oder G-U) aufweisen. Mittels der Datenbanksuche konnten für *A. thaliana* 988, für *A. lyrata* 1490 und für *X. tropicalis* 4976 primäre Treffer identifiziert werden. Nach Anwendung des angepassten Analyseprogramms in Abbildung 5.6 konnten für *A. thaliana* lediglich die beiden schon bekannten katalytisch aktiven HHRz, Ara1 und Ara2, gefunden werden. Im Falle von *A. lyrata* konnte ein Treffer, mit einer Sequenzhomologie von 99% zu Ara1 aus *A. thaliana*, identifiziert werden und für *X. tropicalis* konnten aus der Großzahl der primären Treffer noch 6 katalytisch aktive HHRz herausgefiltert werden.

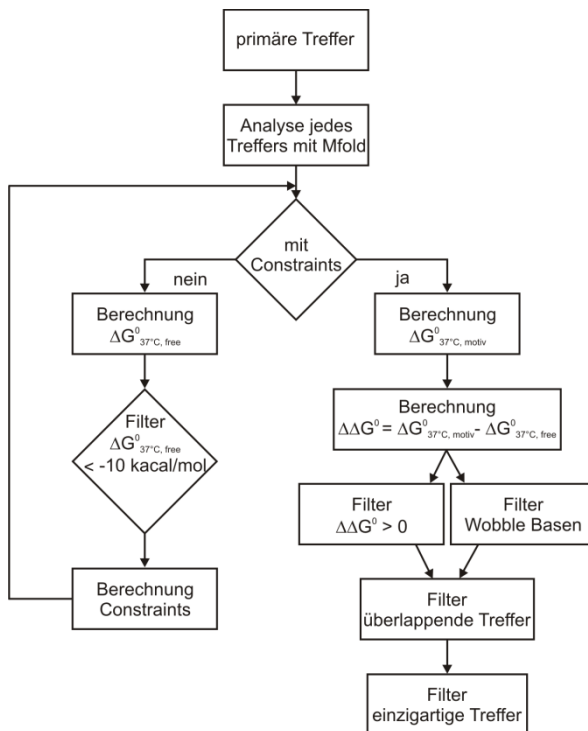


Abb. 5.6: Analyseprogramm der primären Treffer

Die primären Treffer wurden mit Mfold frei und gezwungen gefaltet und die $\Delta G^0_{\text{free-}}$, $\Delta G^0_{\text{motiv-}}$ und $\Delta\Delta G^0$ -Werte für die einzelnen Treffer berechnet. Jeder Treffer wurde anschließend nach $\Delta\Delta G^0 \leq 0$, Wobble-Basen in Helix I und II, überlappende Treffer und einzigartig Treffer gefiltert. Die Filterung erfolgte mit dem von Carsten Seehafer entwickelten Programm RNAhit (Seehafer, 2012), lediglich die Suche nach Wobble-Basen in Helix I und II und die Ausbildung der typischen HHRz Sekundärstruktur bei der freien Faltung erfolgte per Hand.

Die 623609 identifizierten primären Treffer aus den untersuchten Organismen konnten mit Hilfe der oben aufgeführten Experimente und einigen der neu definierten Filterschritte auf weniger als 160 Treffer reduziert werden. Unter diesen 160 Treffern sind noch falsch positive HHRz, die in Helix I und II Wobble-Basenpaarungen und bei der freien Faltung nicht die typische HHRz Sekundärstruktur aufweisen. Dies konnte mit dem Programm RNAhit nicht durchgeführt werden und somit müsste jeder einzelne Treffer per Hand analysiert werden. Die möglichen neuen HHRz stammen aus 50 Eukaryoten und 3 Bakterien (Seehafer et al., 2011).

5.2 Identifizierung und Spaltungsanalyse der HHRz in ihrer genomischen Umgebung

Anhand der oben aufgeführten Ergebnisse konnten in *X. tropicalis* die Sequenzen für 6 katalytisch aktive HHRz identifiziert werden, wobei die DNA Matrizen synthetisch über rekursive PCR hergestellt wurden. In den folgenden Experimenten sollten die 6 HHRz aus *X. tropicalis* aus genomischer DNA amplifiziert und ihre katalytische Aktivität in Abhängigkeit von ihrer natürlichen genomischen Umgebung analysiert werden. Diese Experimente fanden in Zusammenarbeit mit Sara Völkel im Rahmen eines Praktikums statt.

5.2.1 Isolierung der *Xenopus tropicalis* HHRz in ihrer genomischen Umgebung

Für die Identifizierung der HHRz wurde genomische DNA aus der Haut von *X. tropicalis* isoliert und versucht mit geeigneten Oligonukleotidpaaren die Sequenzen der 6 verschiedenen HHRz in einer PCR zu amplifizieren. Die Oligonukleotidpaare wurden so gewählt, dass zusätzlich zu der HHRz Sequenz ca. 200 bp *upstream* und 50 bp *downstream* amplifiziert werden konnten (Abb. 5.5). Am 5'-Ende der *forward* Oligonukleotide wurde die T7 Promotorsequenz (TAATACGACTCACTATA) und das Basentriplett GGG angefügt, um in späteren Experimenten die katalytische Aktivität der gefundenen HHRz in Abhängigkeit ihrer genomischen Umgebung zu untersuchen.

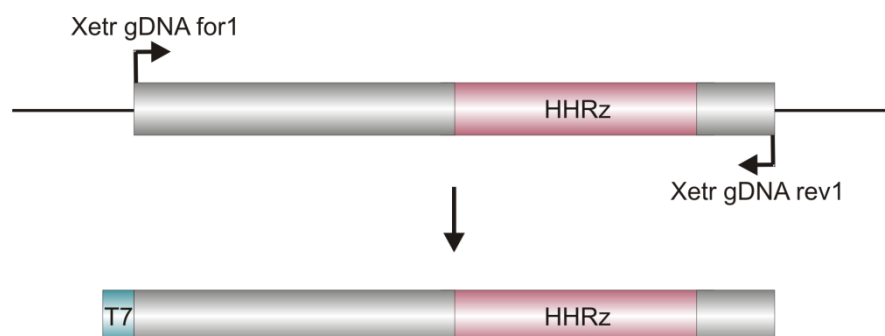


Abb. 5.5: Amplifikation der HHRz Motive von genomischer DNA

Die PCR erfolgt mit Oligonukleotidpaaren die 200 bp *upstream* und 50 bp *downstream* des HHRz Motivs binden. Zusätzlich wurde für die PCR am *forward* Oligonukleotid die T7 Promotorsequenz gefolgt von dem Basentriplett GGG angehängt und resultiert in dem unten dargestellten PCR Produkt.

Zur Sequenzierung der amplifizierten PCR Produkte wurden diese in den Vektor pJET1/blunt ligiert, kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und mittels Kolonie PCR nach potentiell positiven Klonen gescreent. Von diesen Klonen wurde mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit die Plasmid-DNA isoliert, durch die Firma Seqlab sequenziert und mit dem Programm

CLC Sequence Viewer ausgewertet. Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst und detailliert im Anhang A5 aufgeführt.

Tab. 5.3: Sequenzanalyse der *X. tropicalis* HHRz auf genomischer Ebene

Ribozym	Sequenzanalyse auf genomischer DNA Übereinstimmung		Anmerkungen
	HHRz	genom. Umgebung	
Xetr1	99%	98%	T→C Transition an Position 13 im HHRz weiter Mutationen außerhalb der HHRz Struktur
Xetr2	100%	94%	Mutationen außerhalb der HHRz Struktur
Xetr4	99%	0%	T→C Transition an Position 141 im HHRz
Xetr5	97%	94%	T→C Transition an Position 13 im HHRz und weiter Mutationen außerhalb der HHRz Struktur
Xetr7	100%	100%	-
Xetr8	100%	100%	-

Wie aus Tabelle 5.3 hervorgeht konnten alle 6 HHRz auf genomischer Ebene identifiziert werden. Xetr2, 7 und 8 zeigten eine 100%ige Sequenzübereinstimmung zu den annotierten Sequenzen in der Datenbank. Für Xetr7 und 8 konnte untereinander eine Sequenzhomologie von 99% festgestellt werden. Bei Xetr8 ist im Vergleich mit Xetr7 im LoopII zusätzlich ein C vorhanden und anstelle eines T wurde ein G identifiziert. Für Xetr1, 4 und 5 konnten T→C Transitionen in den HHRz festgestellt werden. Dies führt im Falle von Xetr1 zur Vergrößerung des LoopI und bei Xetr4 zur Aufhebung der Wobble-Basenpaarung in Helix III, was aber auf die Ausbildung der typischen HHRz Sekundärstruktur keinen Einfluss hat. Hingegen resultiert die Transition bei Xetr5 in einer Verkürzung der Helix II und einer damit verbundenen Veränderung der Core-Region und Sekundärstruktur des HHRz. In Bezug auf die genomische Umgebung der einzelnen analysierten HHRz konnte nur bei Xetr7 und 8 eine 100%ige Übereinstimmung gefunden werden, alle anderen HHRz zeigten Abweichungen in ihrer Umgebungssequenz zu den in der Datenbank hinterlegten Sequenzen. Auch ein Vergleich der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7 und 8 zeigte eine 99%ige Homologie der beiden Sequenzen, lediglich an Position 159 (Xetr7→A, Xetr8→C) und 316 (Xetr7→A, Xetr8→T) konnte ein Unterschied festgestellt werden. Für Xetr4 war es nicht möglich, mit den gewählten Oligonukleotidpaaren die 200 nt *upstream* und 50 nt *downstream* der eigentlichen HHRz Sequenz binden, das Motiv zu amplifizieren. Jedoch konnte mit spezifischen Oligonukleotiden, die nur das HHRz amplifizieren, Xetr4 auf genomischer Ebene nachgewiesen werden.

5.2.2 Funktionalität der HHRz in Abhängigkeit ihrer genomischen Umgebung

Die Spaltungsaktivität der HHRz in ihrer genomischen Umgebung wurde an den beiden HHRz Xetr7 und 8, welche eine 100%ige Sequenzübereinstimmung zu den annotierten Sequenzen zeigten, untersucht. Hierfür wurde zunächst mit 200 ng des linearisierten Plasmids eine radioaktive *in vitro* Transkription durchgeführt und anschließend wie unter 5.1.1 angegeben in gerichteten Spaltungsexperimenten weiter analysiert. Die Ergebnisse der Spaltungstest sind in Abbildung 5.6 dargestellt. Für ein aktives HHRz würde man im Falle von Xetr7 ein *full length* Transkript von 351 nt und die beiden Spaltprodukte mit 186 nt und 165 nt erwarten und für Xetr8 entsprechend 352 nt, 186 nt und 166 nt.

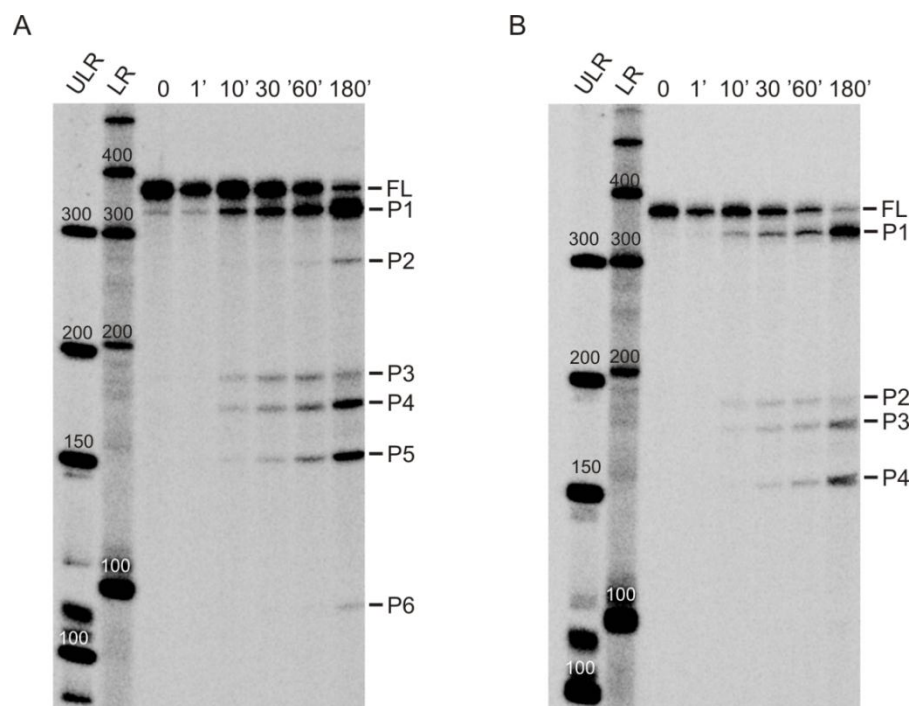


Abb.5.6: Spaltungsanalysen von Xetr7 und 8 in ihrer genom. Umgebungssequenz

A-B 10%ige PAA-Gelelektrophorese der Spaltungsanalysen von Xetr7 und 8 in ihrer genom. Umgebung bei 2 mM $MgCl_2$ und 37°C. Die Visualisierung erfolgte nach einer Exposition von 18-24h mittels eines PhosphorImagers. **A** Xetr7 zeigt eine deutliche Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit, jedoch zerfällt das *full length* Transkript (FL) nicht wie erwartet in die Spaltprodukte P3 (185 nt) und P4 (165 nt), sondern zerfällt nach 3h Inkubation bei 37°C in vier weitere Spaltprodukte P1, P2, P5 und P6. **B** Xetr8 zeigt eine deutliche Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit. Das *full length* Transkript (FL) zerfällt auch nicht wie erwartet in die Spaltprodukte P2 (186 nt) und P3 (166 nt), sondern zerfällt nach 3h Inkubation bei 37°C in zwei weitere Spaltprodukte P1 und P4. Als Größenstandard dienten die radioaktiv markierten Marker: GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (ULR) und RiboRuler™ Low Range RNA Ladder (LR).

Xetr7 und 8 zeigen auch unabhängig von der HHRz umgebenden Sequenz katalytische Aktivität, jedoch spaltet das HHRz nicht wie erwartet das *full length* Transkript in zwei Spaltprodukte, sondern bei Xetr7 entstehen zusätzlich vier und bei Xetr8 zwei weitere Produkte. Außerdem besteht die Wahrscheinlichkeit, dass kleinere Spaltprodukte (< 70 nt) aufgrund der geringen Größe und zugunsten einer besseren Auftrennung im

höhermolekularen Bereich bereits aus dem PAA-Gel gelaufen sind und somit nicht detektiert werden konnten. Wie bereits schon unter 5.2.1 beschrieben wurde, sind die Umgebungssequenzen der beiden HHRz Xetr7 und Xetr8 hochkonserviert und zu 99% identisch. Anhand der hier erhaltenen Ergebnisse für die Spaltungsaktivität der Ribozyme in ihrer genomischen Umgebungssequenz wurden die gefundenen Sequenzen genauer untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass das analysierte *full lenght* Transkript in beiden Fällen nicht nur das bereits bekannte HHRz enthält, sondern darüber hinaus zwei Typ III HHRz und zwei Typ I HHRz vorhanden sind. Eine schematische Darstellung der genomischen Region ist in Abbildung 5.7 dargestellt und dient der Veranschaulichung der im Spaltungstest zusätzlich erhaltenen Banden.

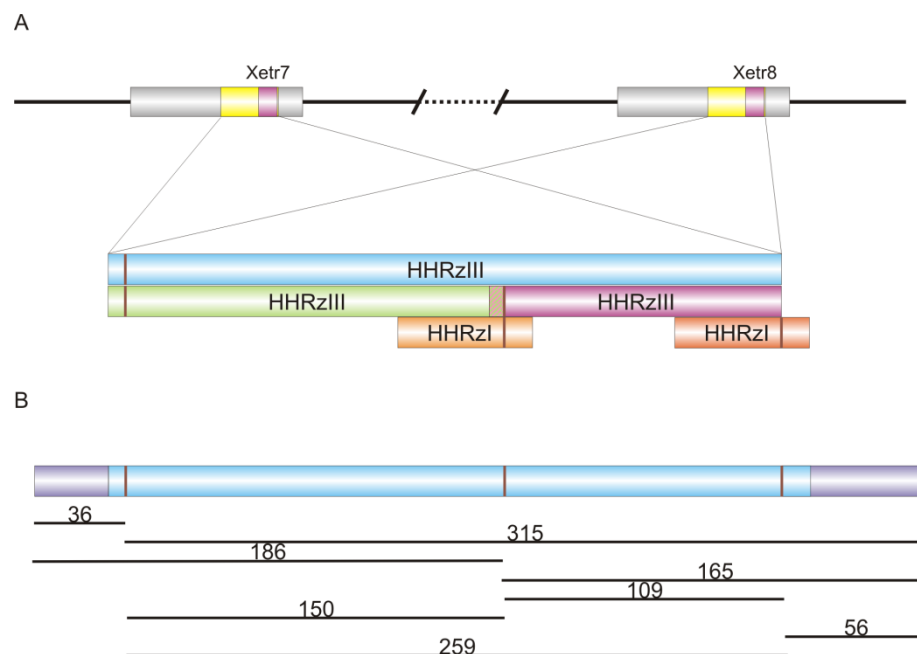


Abb. 5.7: Schematische Darstellung der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7 und Xetr8

A Lokalisation der beiden HHRz Xetr7 und Xetr8 auf dem Plusstrang von scaffold_8 im intergenischen Bereich. Die beiden HHRz liegen in einem hochkonservierten Bereich, welcher sich über eine Gesamtlänge von 826 nt (grau) erstreckt und zu 99% identisch ist. Des Weiteren ist in der Konsensussequenz ein Bereich enthalten (gelb), der neben den beiden bereits bekannten Typ III HHRz (pink) zusätzlich zwei Typ III (blau, grün) und zwei Typ I HHRz (orange) enthält (Bereich vergrößert dargestellt und vom schematischen Aufbau bei beiden HHRz umgebenden Bereichen gleich). **B** Schematische Darstellung des *full lenght* Transkriptes der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7 in der *in vitro* Transkription und der möglichen Fragmentgrößen (in nt) bei Aktivität der in dieser Region neu identifizierten HHRz. In blau ist die HHRz enthaltende Region dargestellt mit den jeweiligen Spaltstellen der Ribozyme (rot).

Die Konsensussequenzen von Xetr7 und Xetr8 erstrecken sich über eine Gesamtlänge von 826 nt, sind zu 99% identisch und sind auf dem Plusstrang von scaffold_8 4314 nt voneinander entfernt. Die hochkonservierte Sequenz enthält in beiden Fällen einen Bereich von 271 nt bzw. 272 nt in denen die neu identifizierten HHRz von Typ III bzw. Typ I liegen. Dabei konnte in der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7 ein neues Typ III HHRz

(HHRzIII (1)) mit einer Länge von 265 nt identifiziert werden, welches wiederum zwei weitere Typ III HHRz enthält. Eines ist das bereits bekannte Xetr7 Motiv und das andere ein neues 156 nt langes HHRz (HHRzIII (2)), beide haben einen Überlappungsbereich von 6 nt (in Abb. 5.7 A durch den schraffierten Bereich gekennzeichnet) und enthalten eines der beiden Typ I HHRz Motive (HHRzI (1)) mit einer Größe von 53 nt. Das andere Typ I Motiv (HHRzI (2)) ist 52 nt und überlappt am 3'-Ende von Xetr7 mit 42 nt. Im Falle der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr8 zeigte sich exakt das gleiche Bild wie bei Xetr7, lediglich die Größe und Sequenz der gefundenen Treffer variiert (siehe Tab. 5.4). Dabei zeigten die beiden gefundenen HHRzIII (1) von Xetr7 und Xetr8 eine Sequenzhomologie von 99% und somit ist auch das in dieser Sequenz liegende HHRzIII (2) dieser beiden Sequenzen zu 99% identisch. Die HHRzI (1) weisen eine 100%ige und die HHRzI (2) eine 96%ige Homologie untereinander auf (Unterschiede in der Sequenz sind in der Tab. 5.4 rot gekennzeichnet).

Tab. 5.4: Sequenz und Größe der neu identifizierten HHRz in der Konsensussequenz von Xetr7 und Xetr8

neue HHRz in Umgebungsseq. von Xetr7	Größe	Sequenz
HHRzIII (1)	265 nt	ACCGGTCTGTAGTTGGGAATCTGGTCTATTTGCGTACGTATGAGGCGGTCTCCTCAA CCCTTTTGACTTGTTCGTGAATCCCCACTCCTGACTCTACCTAAGCTGATCAGAA AA CCCTGCACTACACTGATGAGCCCCAAGAAGGGCGAAACCGGTCTGTAGTTGGGAAT CTTGACTTGTGGTGTGAATCCCCACTCCTGGCTCTACCTAAGCTGATCAGAACACCT GCACTACACTGATGAGCCCCA A AAGGGCGAAACCGGT
HHRzIII (2)	156 nt	ACCGGTCTGTAGTTGGGAATCTGGTCTATTTGCGTACGTATGAGGCGGTCTCCTCAA CCCTTTTGACTTGTTCGTGAATCCCCACTCCTGACTCTACCTAAGCTGATCAGAA AA CCCTGCACTACACTGATGAGCCCCAAGAAGGGCGAAACCGGT
HHRzI (1)	53 nt	CCCTGCACTACACTGATGAGCCCCAAGAAGGGCGAAACCGGTCTGTAGTTGGG
HHRzI (2)	52 nt	CCTGCACTACACTGATGAGCCCCA A AAGGGCGAAACCGGTCTGTAGTTAGG
neue HHRz in Umgebungsseq. von Xetr8	Größe	Sequenz
HHRzIII (1)	266 nt	ACCGGTCTGTAGTTGGGAATCTGGTCTATTTGCGTACGTATGAGGCGGTCTCCTCAA CCCTTTTGACTTGTTCGTGAATCCCCACTCCTGACTCTACCTAAGCTGATCAGAA CA CCCTGCACTACACTGATGAGCCCCAAGAAGGGCGAAACCGGTCTGTAGTTGGGAAT CTTGACTTGTGGTGTGAATCCCCACTCCTGGCTCTACCTAAGCTGATCAGAACACCT GCACTACACTGATGAGCCCC CA AAGGGCGAAACCGGT
HHRzIII (2)	156 nt	ACCGGTCTGTAGTTGGGAATCTGGTCTATTTGCGTACGTATGAGGCGGTCTCCTCAA CCCTTTTGACTTGTTCGTGAATCCCCACTCCTGACTCTACCTAAGCTGATCAGAA CA CCCTGCACTACACTGATGAGCCCCAAGAAGGGCGAAACCGGT
HHRzI (1)	53 nt	CCCTGCACTACACTGATGAGCCCCAAGAAGGGCGAAACCGGTCTGTAGTTGGG
HHRzI (2)	53 nt	CCTGCACTACACTGATGAGCCCC CA AAGGGCGAAACCGGTCTGTTGTTAGG

Anhand der neu identifizierten HHRz lassen sich auch die in Abbildung 5.5 erhaltenen Ergebnisse für die Spaltungsaktivität der HHRz umgebenden Sequenzen von Xetr7 und Xetr8 erklären. Aufgrund der Situation, dass in der analysierten Sequenz mehrere HHRz vorhanden sind, wurde das *full length* Transkript nicht wie erwartet gespalten. Somit entstanden neben den erwarteten Fragmenten von 186 nt und 165 nt, im Falle der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7 noch vier weitere Produkte mit einer Größe von 315 nt (P1), 259 nt (P2), 150 nt

(P5) und 109 nt (P6). Zusätzlich zu diesen vier Spaltprodukten sollten noch zwei kleinere Produkte (<70 nt) entstehen, wenn die neu identifizierten HHRz Spaltungsaktivität besitzen (Abb.5.7 B). Anhand des zeitlich versetzten Auftretens der verschiedenen Spaltprodukte konnte die Aktivität der einzelnen HHRz genauer analysiert werden. Somit spaltet das HHRzIII (1) in der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7 zuerst (s. Abb. 5.6), dabei entstehen zunächst die beiden Spaltprodukte P1 und das 36 nt Fragment, welches bereits aus dem Gel gelaufen ist. Nach ca. 10 min war auch die Spaltung der anderen beiden HHRz, HHRzIII (2) und Xetr7, zu beobachten und resultiert in den Produkten P3, P4 und P5. Die Aktivität des HHRzI (2) war erst mit dem Auftreten der Produkte P2 und P6 nach einer Inkubation von 3h bei 37°C nachweisbar. Über die Aktivität des zweiten Typ I HHRz kann in diesem Experiment keine Aussage gemacht werden, da es mit Xetr7 eine gemeinsame Spaltstelle besitzt. Jedoch konnte in einem Spaltungsexperiment indem nur das HHRzI (2) untersucht wurde, eine Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der starken Homologie der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7 und Xetr8, sollte auch im Falle von Xetr8 eine Spaltaktivität der neu gefundenen Treffer vorliegen. Jedoch konnten neben den erwarteten 186 nt und 166 nt großen Fragmenten, nur zwei weitere Spaltprodukte mit einer Größe von 316 nt (P1) und 150 nt beobachtet werden. Dies bedeutet im Falle der neu identifizierten HHRz in der Umgebungssequenz von Xetr8, dass nicht alle HHRz Spaltungsaktivität unter den angegebenen Versuchsbedingungen aufweisen. Das Fehlen der erwarteten Spaltprodukte mit einer Größe von 260 nt und 110 nt deutet darauf hin, dass das HHRzI (2) in der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr8 nicht aktiv ist bzw. die Inkubationszeit von 3h bei 37°C nicht ausreichend war. Ein direkter Vergleich der beiden HHRzI (2) aus der Umgebungssequenz von Xetr7 und Xetr8 hat jedoch gezeigt, dass es in der Sekundärstruktur der Helix 1 von HHRzI (2) aus Xetr8 zur Bildung eines Mismatches kommt (s. Abb. 5.8) und dies die mögliche Ursache der fehlenden Aktivität sein könnte.

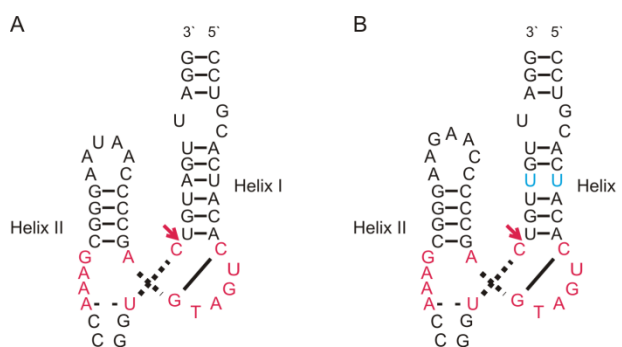


Abb. 5.8: Struktur der beiden HHRzI (2) aus der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7 und Xetr8

A Sekundärstruktur des neu identifizierten HHRzI (2) aus der Umgebungssequenz von Xetr7.

B Sekundärstruktur des HHRzI (2) aus der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr8. In blau ist die Fehlbasenpaarung in Helix I im Vergleich zu dem HHRzI (2) aus der Umgebungssequenz von Xetr7 hervorgehoben. Die rot gekennzeichneten Nukleotide stellen die Core-Region dar und der Pfeil markiert die Spaltstelle.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle sechs unter 5.1 gefundenen HHRz aus *X. tropicalis*, die eine katalytische Aktivität in *in vitro* Analysen aufwiesen, auch auf genomischer Ebene nachgewiesen werden konnten. Dies ist aufgrund der fehlenden Genomsequenz nicht selbstverständlich. Zusätzlich konnten in der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7 und Xetr8 sieben weitere individuelle HHRz identifiziert werden, die in vorherigen Datenbanksuchen nicht gefunden werden konnten. Dabei handelt es sich um vier Typ III HHRz und drei Typ I HHRz. Für sechs der sieben Treffer konnte auch eine katalytische Aktivität nachgewiesen werden.

5.3 Expressionsanalyse der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7 und Xetr8

Zur *ex vivo* Analyse der Expression einer spezifischen RNA aus Gesamt-RNA von *X. tropicalis* diente die Methode des S1 Nuklease Protektionassays (s. 4.3.24). Dafür wurden aus verschiedenen Geweben (Bein, Ei und Leber), eines adulten *X. tropicalis* Weibchens, Gesamt-RNA isoliert. Als Sonde diente ein 294 nt bzw. 295 nt großes antisense Transkript aus der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7 und Xetr8, welches die neu identifizierten HHRz enthielt (Sequenz im Anhang A6 dargestellt). Die Sonde wurde in einer PCR hergestellt, sequenziert und in einer *in vitro* Transkription radioaktiv markiert. Anschließend wurde das Transkript in einem 10%igem PAA-Gel aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt. Die Hybridisierung erfolgte ü.N. bei 60°C mit je 2 µg Gesamt-RNA aus den spezifischen Geweben. In der folgenden S1 Behandlung wurde die verbleibende einzelsträngige RNA und DNA abgebaut, somit sollten nur die entstandenen Hybridstrukturen aus der Sonde und dem komplementären Sequenzabschnitt der mRNA erhalten bleiben. Die Ergebnisse des S1 Nuklease Protektionassays sind am Beispiel der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7 in Abbildung 5.9 dargestellt.

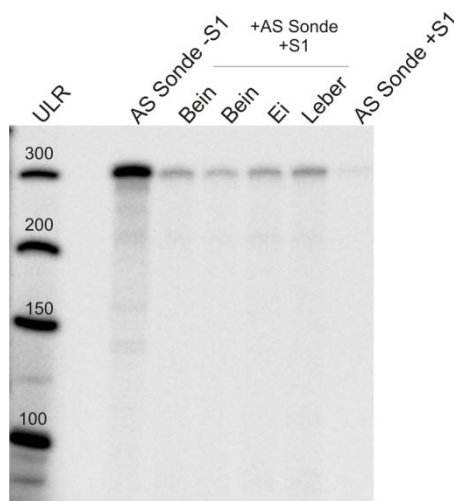


Abb. 5.9: S1 Nuklease Protektionassay auf Gesamt-RNA verschiedener Gewebe von *X. tropicalis*

Die Hybridisierung erfolgte mit 2 µg DNase behandelter RNA und einer 294 nt großen antisense Sonde der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7. Als Negativkontrolle wurde die antisense Sonde mit der Nuklease S1 gespalten (AS Sonde +S1) und als Positivkontrolle diente eine antisense Sonde welche nicht mit dem Enzym S1 behandelt wurde (AS Sonde -S1). Als Größenstandard wurde der zuvor radioaktiv markierte Marker: GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (ULR) verwendet. Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem 10%igem PAA-Gel und wurde nach einer Exposition von 24h mittels einem PhosphorImagers visualisiert.

Wie aus Abbildung 5.8 hervorgeht konnte in der Gesamt-RNA der untersuchten Gewebe (Bein, Ei und Leber) von *X. tropicalis* mit der eingesetzten Sonde das ungespaltene Transkript mit einer Größe von 294 nt nachgewiesen werden, wobei die Expression der spezifischen RNA in allen Geweben gleich stark ist. Es konnte kein gespaltenes Transkript in den spezifischen Geweben beobachtet werden, denn in diesem Falle wäre ein ähnliches Bandenmuster zu erwarten gewesen wie bei den in Abbildung 5.6 dargestellten Spaltungsanalysen der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7. Die Funktionalität des S1 Nuklease Protektionassay konnte anhand der verwendeten Kontrollen überprüft werden. Somit sollte die antisense Sonde nach einer S1 Behandlung (AS Sonde +S1) nicht mehr nachweisbar sein und die unbehandelte Sonde (AS Sonde –S1) eine deutliche Bande auf der Höhe von 294 nt zeigen. Dies konnte wie aus dem PAA-Gel hervorgeht beobachtet werden und somit ist ausgeschlossen, dass die detektierten Signale in den spezifischen Geweben von unverdauter Sonde stammen. Die Expressionsanalyse der spezifischen RNA der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr8 zeigte ebenfalls eine gleich starke Expression des ungespaltenen Transkripts in den untersuchten Geweben (Daten nicht gezeigt). Somit konnte sowohl für die HHRz umgebende Sequenz von Xetr7 als auch von Xetr8 die Expression der RNA nachgewiesen werden, jedoch konnte keine bereits gespaltene RNA beobachtet werden.

5.4 Analyse der Spaltungsaktivität verschiedener Typ III HHRz Mutanten

Für die Ausbildung der katalytisch aktiven Form des HHRz, werden tertiäre Interaktionen zwischen den terminalen oder internen Loops der Helix I und II ausgebildet (Khvorova et al., 2003; de la Peña et al., 2003). Des Weiteren zeigt die Core-Region eine hochkonservierte Sequenz bestehend aus 11 Nukleotiden, dabei ist die Spaltstelle so definiert, dass an Position 17 ein A, C oder U aber kein G vorhanden sein sollte. Im Falle eines G an dieser Position sollte es zu einer Basenpaarung mit dem gegenüberliegenden C an Position 3 kommen und somit die Spaltstelle blockiert werden. In *in vitro* Experimenten konnte jedoch wie aus Abbildung 5.3 hervorgeht eine katalytische Aktivität für die Xetr1 G17 Mutante beobachtet werden. Weiterhin konnte in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe an *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden, dass verschiedene Loop-Mutationen einen Einfluss auf die katalytische Aktivität haben (Przybilski et al., 2005). Basierend auf diesen Experimenten und Beobachtungen sollte anhand unterschiedlicher Typ III HHRz-Mutanten der Einfluss der veränderten Core-Region bzw. interagierenden Loop-Bereiche auf die katalytische Aktivität *in vitro* und *in vivo* näher untersucht werden.

5.4.1 Herstellung der verschiedenen Typ III HHRz Mutanten

Die Untersuchung der katalytischen Aktivität erfolgte an Mutanten von vier verschiedenen Typ III HHRz Wildtypsequenzen. Dabei handelt es sich um zwei der 6 neu identifizierten HHRz-Motive aus *X. tropicalis* (Xetr2 und Xetr5), ein bereits bekanntes HHRz aus dem *Peach latent mosaic* Viroid (PLMVd) und Ara1 aus *A. thaliana*. Mittels rekursiver PCR sollten von allen HHRz Wildtypsequenzen fünf verschiedene Mutanten hergestellt werden. Zum einen eine G17-Mutante, wo an Position 17 in der Core-Region des HHRz das C durch ein G ersetzt wird und zum anderen verschiedene Poly-C Loop1- und/oder Loop2-Mutanten, in denen die gesamte Loop-Sequenz durch Cytosine ersetzt werden sollte. Anhand der PolyC-Loop Mutanten sollte der Einfluss der Loop Nukleotide auf die Spaltungsreaktion untersucht werden. Abbildung 5.10 gibt am Beispiel von Ara1 einen Überblick über die verschiedenen Mutanten.

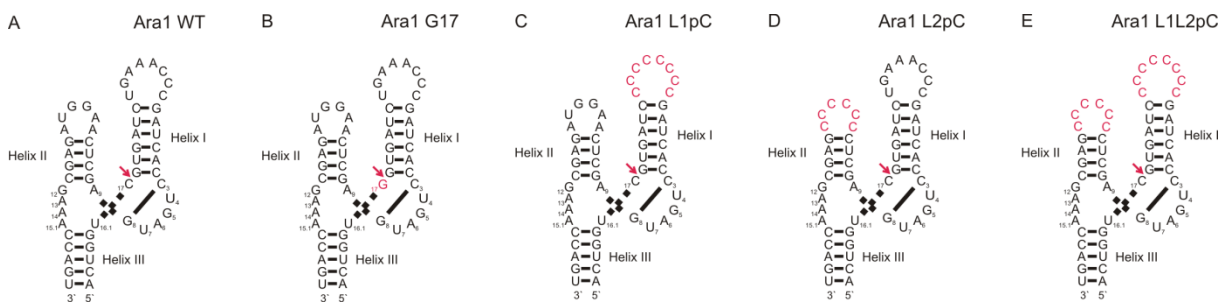


Abb. 5.10: Strukturen der generierten Mutanten am Beispiel von Ara1

Überblick über die Sekundärstrukturen der generierten Mutanten basierend auf der Wildtypsequenz (A) am Beispiel von Ara1. B Ara1 G17 Mutante mit einem G an Position 17 anstatt einem C. C Ara1 L1pC Mutante, gesamter Loop1 durch C ersetzt. D Ara1 L2pC Mutante, gesamter Loop2 durch C ersetzt. E Ara1 L1L2pC Mutante, Loop1 und 2 durch C ersetzt. Die Veränderungen im Vergleich zum WT sind rot hervorgehoben und die Spaltstelle ist mit einem roten Pfeil markiert.

Nach Veränderung der WT-Sequenz der einzelnen HHRz wurden diese mittels Mfold auf die Ausbildung der HHRz typischen Sekundärstruktur analysiert. Wie bereits in oben aufgeführten Experimenten gezeigt werden konnte, kann die Veränderung der Sekundärstruktur zu einer veränderten katalytischen Aktivität führen. Dabei konnte im Falle von Xetr2 eine Veränderung der Sekundärstruktur bei der Xetr2 L1pC Mutante und folglich auch bei der Xetr2 L1L2pC Mutante festgestellt werden. Somit wurde nur die Sequenz von der G17 und der L2pC Mutante in den folgenden Experimenten analysiert. Alle anderen Motive zeigten im Vergleich zum WT keine veränderte Sekundärstruktur durch die vorgenommenen Mutationen in der Core-Region und den Loop-Bereichen (die einzelnen Sekundärstrukturen der verschiedenen HHRz-Motive sind im Anhang A7 dargestellt).

Die Konstrukte wurden mittels überlappender Oligonukleotide in einer rekursiven PCR hergestellt, in den pJET 1/blunt Vektor kloniert und sequenziert. Zur späteren *in vivo* Analyse war es notwendig die HHRz Motive durch Anbringen geeigneter Schnittstellen zunächst in den pGEM[®]-T Easy Vektor zu klonieren. Dafür wurden Oligonukleotide entworfen, die am 5'- und 3'-Ende der HHRz Sequenz zusätzlich eine *Xho*I-Schnittstelle aufweisen (s. 4.1.9). Die PCR-Produkte wurden von den jeweiligen HHRz Motiv enthaltenden pJET1/blunt Vektoren amplifiziert, in pGEM[®]-T Easy kloniert und sequenziert.

5.4.2 *In vitro* Spaltungskinetiken der verschiedener TypIII HHRz Mutanten

Für die Untersuchung der katalytischen Aktivität der HHRz Mutanten wurde Plasmid-DNA aus den HHRz enthaltenden pGEM[®]-T Easy Vektoren isoliert und mit dem Restriktionsenzym *Spe*I linearisiert. Die Herstellung der *full lenght* Transkripte, erfolgte mittels T7 RNA Polymerase in einer radioaktiven *in vitro* Transkription und anschließender PAA-Gelaufreinigung. Die dabei entstandenen Konstrukte enthalten zusätzlich zum HHRz Motiv noch 65 nt vom pGEM[®]-T Easy Vektor und haben die in der Tabelle 5.5 gezeigten Größen.

Tab. 5.5: Erwartete Größen der *full lenght* Transkripte und Spaltprodukte der HHRz Motive

HHRz	<i>full lenght</i> Transkript (nt)	Spaltprodukt P1 (nt)	Spaltprodukt P2 (nt)
Xetr2 WT/Mutanten	195	123	72
Xetr5 WT/Mutanten	175	103	72
Ara1 WT/Mutanten	139/133*	73	66/60*
PLMVd WT/Mutanten	138	75	63

* Ara1 L2pC zeigte ein verkürztes Transkript durch fehlende *Sac*I Schnittstelle am 3'-Ende des HHRz

Die Analyse der katalytischen Aktivität der einzelnen Typ III HHRz Mutanten erfolgte im Vergleich zum WT in gerichteten Spaltungsexperimenten in Abhängigkeit von der Zeit, bei 37°C und 2 mM MgCl₂. Für die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeiten (k_{obs}) wurde die gespaltene Fraktion $F(t)$ für jeden Zeitpunkt aus der Intensität der beiden Spaltprodukte durch die Intensität der Spaltprodukte und der *full lenght* Transkripte errechnet, gegen die Zeit aufgetragen und durch lineare Regression die kinetischen Parameter nach der Gleichung $F(t) = F_0 + F_{\infty}(1 - e^{-kt})$ bestimmt. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Spaltungsanalysen der einzelnen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp dargestellt.

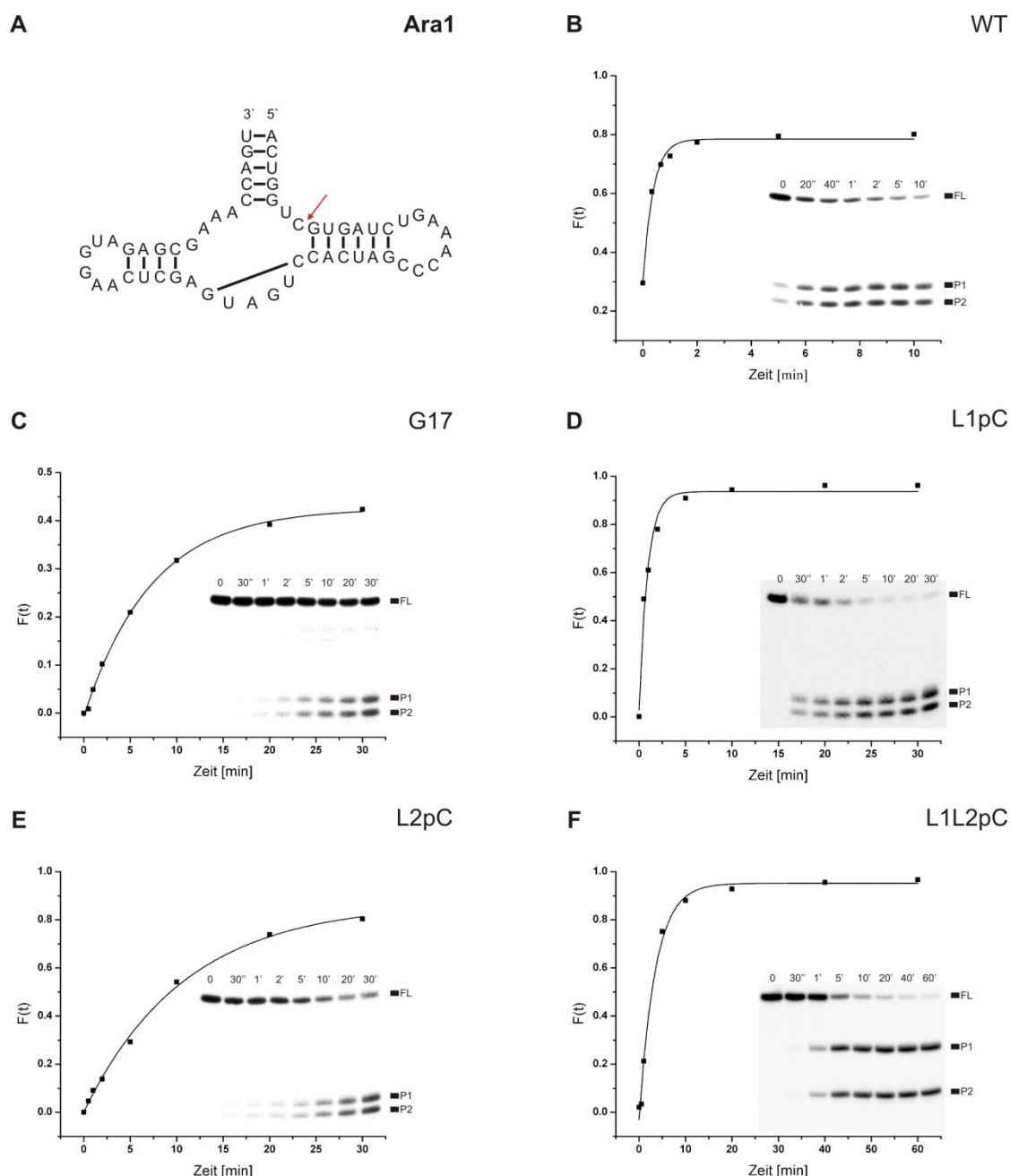


Abb. 5.11: Spaltungskinetiken der Ara1 Mutanten im Vergleich zum WT

A Sekundärstruktur des TypIII HHRz Motiv Ara1 (WT) aus *A. thaliana*, mit der Spaltstelle markiert durch einen roten Pfeil und dem Watson-Crick Basenpaar in der Core-Region. **B-F** Auswertung der Spaltungskinetiken von Ara1 WT und den Mutanten. Die Spaltungsreaktion wurde bei 37°C in 10 mM Tris/HCl (pH 7,6), 0,1 mM EDTA und 10 mM NaCl durchgeführt und mit 2 mM MgCl₂ gestartet. Die gespaltene Fraktion $F(t)$ wird für jeden Zeitpunkt aus der Intensität der beiden Spaltprodukte (P1 und P2) durch die Intensität der Spaltprodukte und der *full length* Transkripte (FL) errechnet, gegen die Zeit aufgetragen und durch Regression die kinetischen Parameter nach der Gleichung $F(t) = F_0 + F_\infty(1 - e^{-k_{\text{obs}}t})$ bestimmt. Die Spaltkonstante k_{obs} in min⁻¹ ist ein Mass für die Geschwindigkeit der Reaktion (Stage-Zimmermann und Uhlenbeck, 1998). Das Gelbild zeigt den Zerfall des *full length* Transkriptes in die beiden Spaltprodukte P1 und P2 in Abhängigkeit von der Zeit und wurde nach einer Exposition von 18-24h mittels eines PhosphorImagers visualisiert. **B** Spaltungskinetik von Ara1 WT mit einem k_{obs} -Wert von 2,72 min⁻¹. **C** Spaltungskinetik von Ara1 G17 Mutante mit einem k_{obs} -Wert von 0,14 min⁻¹. **D** Spaltungskinetik von Ara1 L1pC Mutante mit einem k_{obs} -Wert von 1,11 min⁻¹. **E** Spaltungskinetik von Ara1 L2pC Mutante mit einem k_{obs} -Wert von 0,09 min⁻¹. **F** Spaltungskinetik von Ara1 L1L2pC Mutante mit einem k_{obs} -Wert von 0,29 min⁻¹.

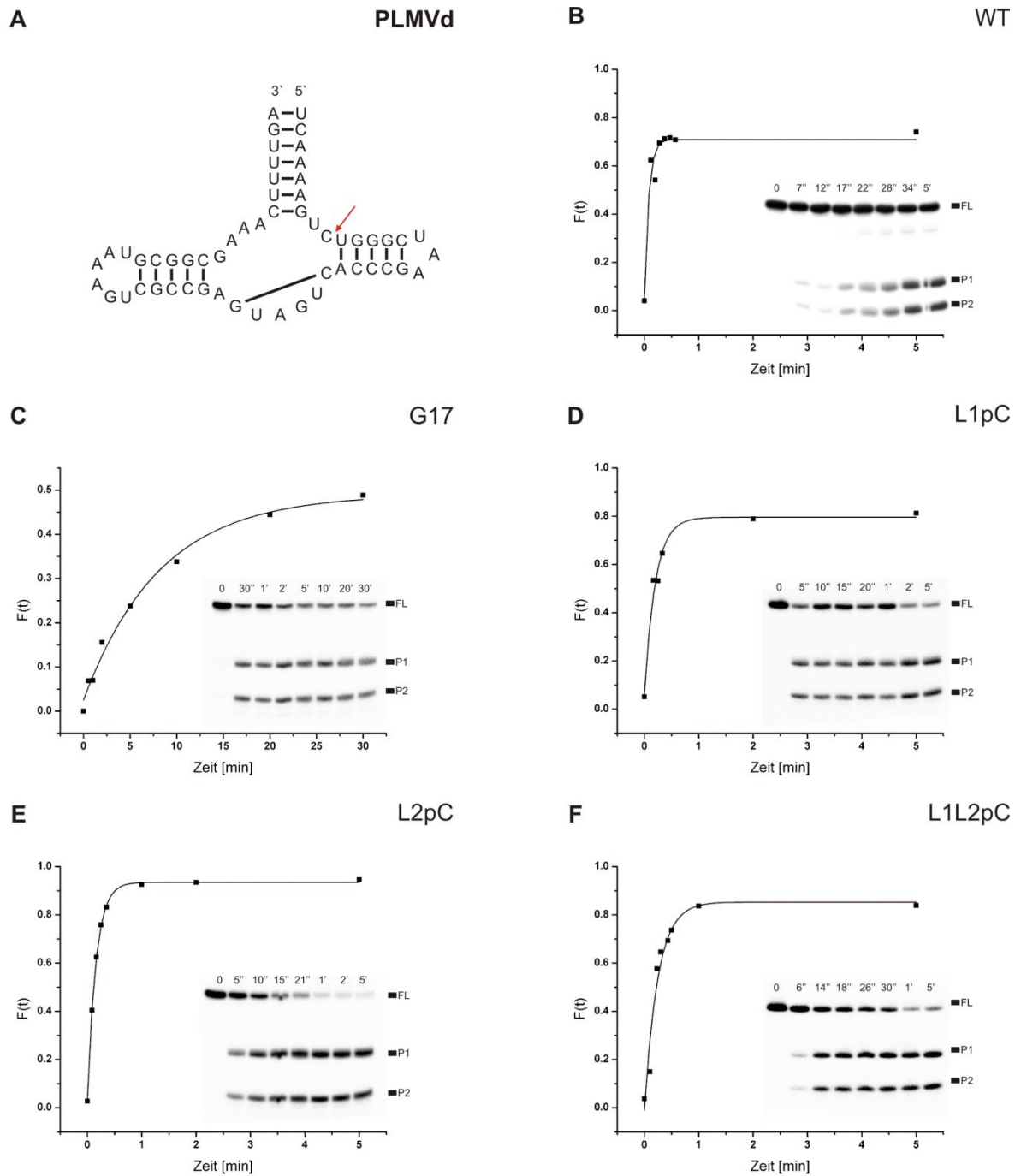


Abb. 5.12: Spaltungskinetiken der PLMVd Mutanten im Vergleich zum WT

A Sekundärstruktur des TypIII HHRz Motiv PLMVd (WT) aus dem *Peach latent mosaik* Virod, mit der Spaltstelle markiert durch einen roten Pfeil und dem Watson-Crick Basenpaar in der Core-Region. **B-F** Auswertung der Spaltungskinetiken von PLMVd WT und den Mutanten. Die Spaltungsreaktion wurde bei 37°C in 10 mM Tris/HCl (pH 7,6), 0,1 mM EDTA und 10 mM NaCl durchgeführt und mit 2 mM MgCl₂ gestartet. Die gespaltene Fraktion $F(t)$ wird für jeden Zeitpunkt aus der Intensität der beiden Spaltprodukte (P1 und P2) durch die Intensität der Spaltprodukte und der *full length* Transkripte (FL) errechnet, gegen die Zeit aufgetragen und durch Regression die kinetischen Parameter nach der Gleichung $F(t) = F_0 + F_\infty(1 - e^{-k t})$ bestimmt. Die Spaltkonstante k_{obs} in min⁻¹ ist ein Mass für die Geschwindigkeit der Reaktion (Stage-Zimmermann und Uhlenbeck, 1998). Das Gelbild zeigt den Zerfall des *full length* Transkriptes in die beiden Spaltprodukte P1 und P2 in Abhängigkeit von der Zeit und wurde nach einer Exposition von 18-24h mittels eines PhosphorImagers visualisiert. **B** Spaltungskinetik von PLMVd WT mit einem k_{obs} -Wert von 12,62 min⁻¹. **C** Spaltungskinetik von PLMVd G17 Mutante mit einem k_{obs} -Wert von 0,12 min⁻¹. **D** Spaltungskinetik von PLMVd L1pC Mutante mit einem k_{obs} -Wert von 4,99 min⁻¹. **E** Spaltungskinetik von PLMVd L2pC Mutante mit einem k_{obs} -Wert von 6,43 min⁻¹. **F** Spaltungskinetik von PLMVd L1L2pC Mutante mit einem k_{obs} -Wert von 2,92 min⁻¹.

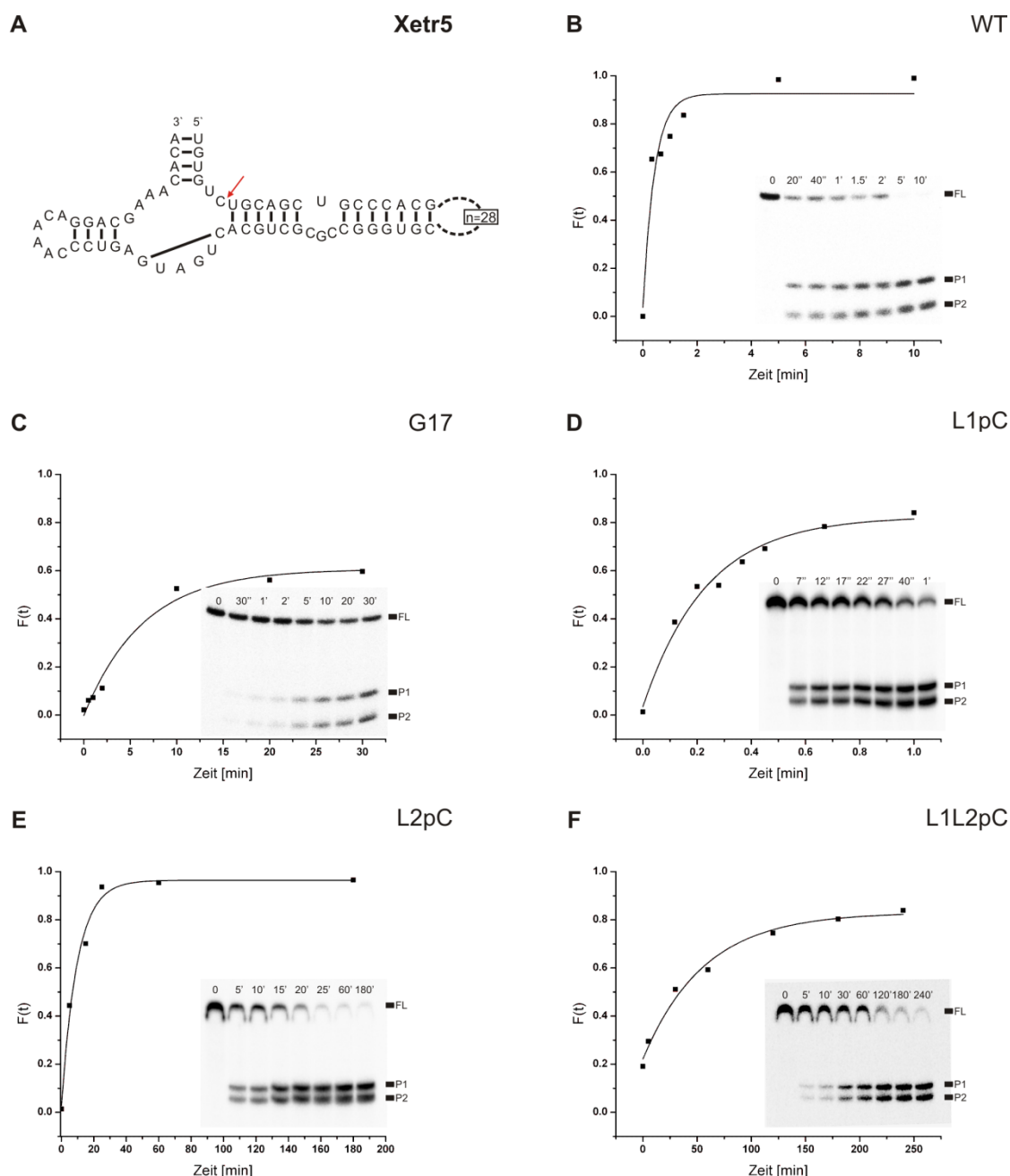


Abb. 5.13: Spaltungskinetiken der Xetr5 Mutanten im Vergleich zum WT

A Sekundärstruktur des TypIII HHRz Motiv Xetr5 (WT) aus *X. tropicalis*, mit der Spaltstelle markiert durch einen roten Pfeil und dem Watson-Crick Basenpaar in der Core-Region. **B-D** Auswertung der Spaltungskinetiken von Xetr5 WT und den Mutanten. Die Spaltungsreaktion wurde bei 37°C in 10 mM Tris/HCl (pH 7,6), 0,1 mM EDTA und 10 mM NaCl durchgeführt und mit 2 mM MgCl₂ gestartet. Die gespaltene Fraktion F(t) wird für jeden Zeitpunkt aus der Intensität der beiden Spaltprodukte (P1 und P2) durch die Intensität der Spaltprodukte und der full length Transkripte (FL) errechnet, gegen die Zeit aufgetragen und durch Regression die kinetischen Parameter nach der Gleichung $F(t) = F_0 + F_\infty(1 - e^{-k_t t})$ bestimmt. Die Spaltkonstante k_{obs} in min⁻¹ ist ein Mass für die Geschwindigkeit der Reaktion (Stage-Zimmermann und Uhlenbeck, 1998). Das Gelbild zeigt den Zerfall des full length Transkriptes in die beiden Spaltprodukte P1 und P2 in Abhängigkeit von der Zeit und wurde nach einer Exposition von 18-24h mittels eines PhosphorImagers visualisiert. **B** Spaltungskinetik von Xetr5 WT mit einem k_{obs} -Wert von 2,37 min⁻¹. **C** Spaltungskinetik von Xetr5 G17 Mutante mit einem k_{obs} -Wert von 0,16 min⁻¹. **D** Spaltungskinetik von Xetr5 L1pC Mutante mit einem k_{obs} -Wert von 4,28 min⁻¹. **E** Spaltungskinetik von Xetr5 L2pC Mutante mit einem k_{obs} -Wert von 0,10 min⁻¹. **F** Spaltungskinetik von Xetr5 L1L2pC Mutante mit einem k_{obs} -Wert von 0,02 min⁻¹.

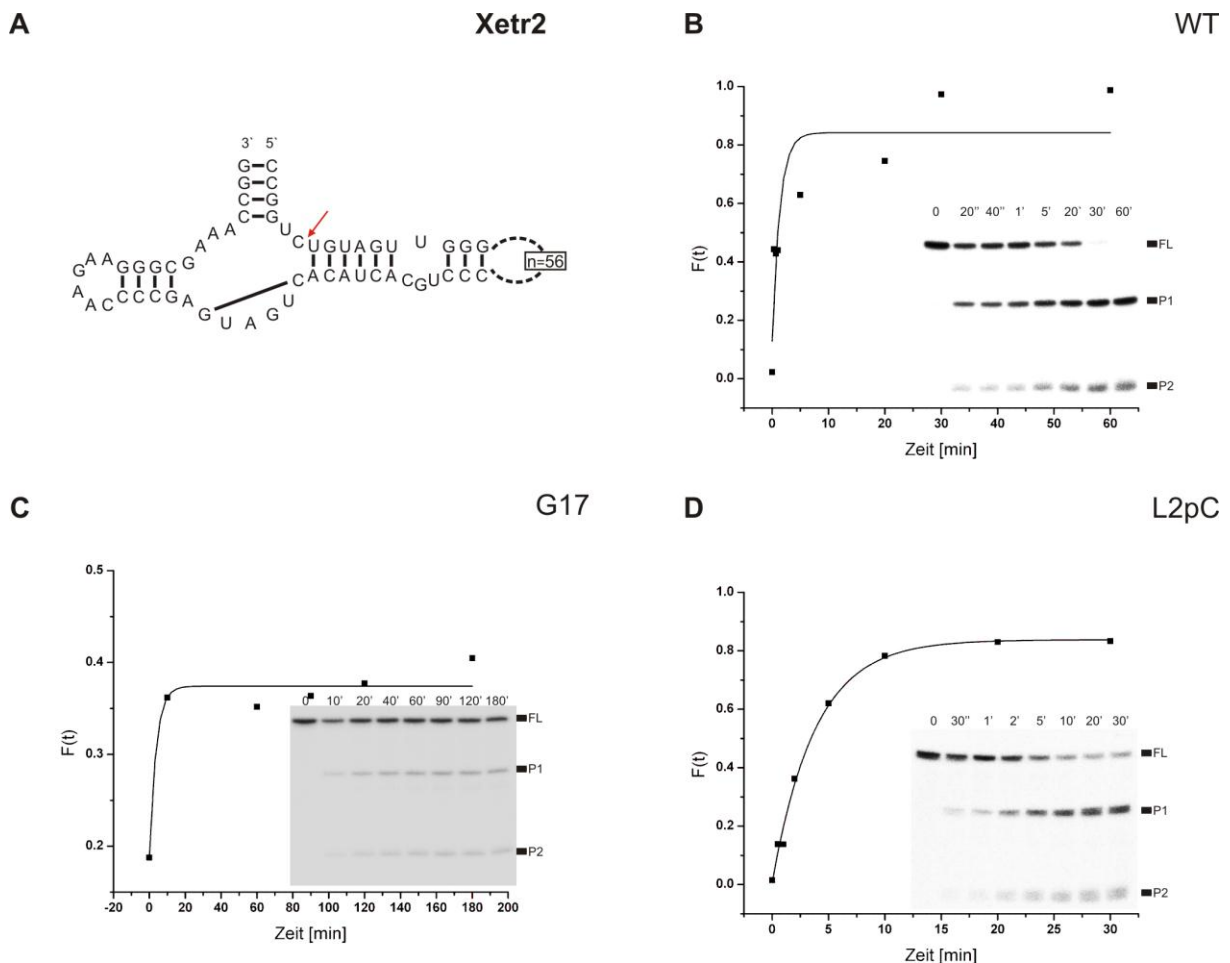


Abb. 5.14: Spaltungskinetiken der Xetr2 Mutanten im Vergleich zum WT

A Sekundärstruktur des TypIII HHRz Motiv Xetr2 (WT) aus *X. tropicalis*, mit der Spaltstelle markiert durch einen roten Pfeil und dem Watson-Crick Basenpaar in der Core-Region. **B-D** Auswertung der Spaltungskinetiken von Xetr2 WT und den Mutanten. Die Spaltungsreaktion wurde bei 37°C in 10 mM Tris/HCl (pH 7,6), 0,1 mM EDTA und 10 mM NaCl durchgeführt und mit 2 mM MgCl₂ gestartet. Die gespaltene Fraktion $F(t)$ wird für jeden Zeitpunkt aus der Intensität der beiden Spaltprodukte (P1 und P2) durch die Intensität der Spaltprodukte und der *full length* Transkripte (FL) errechnet, gegen die Zeit aufgetragen und durch Regression die kinetischen Parameter nach der Gleichung $F(t) = F_0 + F_\infty(1 - e^{-k_t t})$ bestimmt. Die Spaltkonstante k_{obs} in min^{-1} ist ein Mass für die Geschwindigkeit der Reaktion (Stage-Zimmermann und Uhlenbeck, 1998). Das Gelbild zeigt den Zerfall des *full length* Transkriptes in die beiden Spaltprodukte P1 und P2 in Abhängigkeit von der Zeit und wurde nach einer Exposition von 18-24h mittels eines PhosphorImagers visualisiert. **B** Spaltungskinetik von Xetr2 WT mit einem k_{obs} -Wert von 0,74 min^{-1} . **C** Spaltungskinetik von Xetr2 G17 Mutante mit einem k_{obs} -Wert von 0,27 min^{-1} . **D** Spaltungskinetik von Xetr2 L2pC Mutante mit einem k_{obs} -Wert von 0,26 min^{-1} .

Spaltungskinetiken der Ara1 Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

Basierend auf den in Abbildung 5.11 dargestellten Spaltungskinetiken für die Ara1 HHRz Motive, konnte für alle analysierten Konstrukte eine katalytische Aktivität bei 2 mM MgCl₂ nachgewiesen werden. Die 139 nt langen *full length* Transkripte sind in Abhängigkeit von der Zeit in die beiden Spaltprodukte P1 mit 73 nt und P2 mit 66 nt zerfallen, wobei sowohl die Geschwindigkeit als auch das Ausmaß der Spaltungen sehr unterschiedlich waren. Aufgrund der fehlenden *SacI* Schnittstelle am 3'-Ende des Ara1 L2pC Motivs sind das *full length* Transkript und das Spaltprodukt P2 um 6 nt kleiner als bei den anderen Motiven. Das Ara1

WT Motiv (Abb. 5.11 **A**) zeigte die stärkste Aktivität mit einem k_{obs} -Wert von $2,74 \text{ min}^{-1}$ und einer Spaltungseffizienz von ca. 80%. Entgegen aller Erwartungen konnte auch bei der Ara1 G17 Mutante (Abb. 5.11 **B**) eine Aktivität ($k_{\text{obs}} = 0,14 \text{ min}^{-1}$) beobachtet werden, jedoch zeigte sich, dass die Effizienz mit 45% deutlich geringer ist als beim Ara1 WT. Eine ähnliche Geschwindigkeit zeigte sich auch bei der Ara1 L2pC Mutante (Abb. 5.11 **D**) mit einem k_{obs} -Wert von $0,09 \text{ min}^{-1}$, wobei hier mehr als 80% des HHRz nach 30 min Inkubation bei 37°C gespalten wurden. Auch die beiden anderen Poly-C Loop Mutanten Ara1 L1pC und Ara1 L1L2pC (Abb. 5.11 **C** und **E**) sind mit einer Spaltungsgeschwindigkeit von $1,11 \text{ min}^{-1}$ bzw. $0,29 \text{ min}^{-1}$ katalytisch aktiv. Durch die Mutationen der Loops wird zwar im Vergleich zum Wildtyp die Reaktionsgeschwindigkeit verringert, jedoch bleibt die Effizienz der Spaltung mit 80-95% sehr hoch und somit konnte auch die für die Spaltung nötige Interaktion des Loop 1 und 2 beobachtet werden.

Spaltungskinetiken der PLMVd Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

Im Falle der PLMVd Motive zeigte sich ein ähnliches Verhalten wie bei den analysierten Ara1 Konstrukten. Auch hier war die Aktivität des PLMVd WT (Abb. 5.12 **B**), mit einem k_{obs} -Wert von $12,62 \text{ min}^{-1}$ und einer Effizienz von 75%, im Vergleich zu den Mutanten (k_{obs} -Wert von 0,12 bis 6,43) am stärksten. Die PLMVd G17 Mutante (Abb. 5.12 **C**) zeigte mit einem k_{obs} -Wert von $0,12 \text{ min}^{-1}$ und einer Spaltungseffizienz von 50% eine sehr schwache Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Dies wird auch in dem Gelbild des Spaltungstest für PLMVd G17 deutlich, da im Verlauf der Spaltung zwischen der 30 sec- und 30 min-Probe optisch kein Unterschied in der Intensität der Banden für das *full length* Transkript und die beiden Spaltungsprodukte P1 und P2 sichtbar war. Die drei Poly-C Loop Mutanten PLMVd L1pC, L2pC und L1L2pC verfügen wie aus Abbildung 5.12 **D-E** hervorgeht ebenfalls über die nötige Interaktion der Loops 1 und 2 und weisen untereinander mit einer Spaltungseffizienz von 80-90% eine ähnliche katalytische Aktivität auf.

Spaltungskinetiken der Xetr5 Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

Aus den Spaltungsanalysen der Xetr5 Konstrukte konnte für die Xetr5 L1pC Mutante mit einem k_{obs} von $4,28 \text{ min}^{-1}$ im Vergleich zum WT mit $2,37 \text{ min}^{-1}$ die stärkste Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 5.13 **B** und **D**). Die Spaltungseffizienz lag mit Ausnahme der G17 Mutante bei allen Motiven zwischen 80-95%. Für die G17 Mutante (Abb. 5.13 **C**) konnte erneut die geringste Aktivität beobachtet werden, da in Abhängigkeit von der Zeit, auch nach einer 30minütigen Inkubation mit 2 mM MgCl_2 , nur ca. 50% des *full length* Transkripts

gespalten wurden. Die Mutation des Loop II scheint zu einer verringerten Interaktion zwischen Loop1 und 2 zu führen (Abb. 5.13 E-F), da in beiden Fällen im Vergleich zum WT und der Xetr5 L1pC Mutante die Reaktionsgeschwindigkeit mit $0,10 \text{ min}^{-1}$ bzw. $0,02 \text{ min}^{-1}$ deutlich abnimmt.

Spaltungskinetiken der Xetr2 Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

Im Falle der Spaltungskinetiken der Xetr2 Motive konnten aufgrund von Veränderungen der Sekundärstruktur durch die Poly-C Loop1 Mutation, nur die Xetr2 G17 und die Xetr2 L2pC Mutante im Vergleich zum Wildtyp analysiert werden. Die Aktivität des Xetr2 WT Motivs ist mit einem k_{obs} -Wert von $0,74 \text{ min}^{-1}$ deutlich geringer als die der anderen Wildtypsequenzen, jedoch beträgt die Spaltungseffizienz auch hier mehr als 80%. Das Xetr2 L2pC *full length* Transkript mit 195 nt wurde in Abhängigkeit von der Zeit zu 80% in die beiden Spaltprodukt von 123 nt (P1) und 72 nt (P2) gespalten (Abb. 5.14 D). Hingegen zeigte die Xetr2 G17 Mutante erneut eine geringere Spaltungseffizienz mit nur 37%, da, wie aus Abbildung 5.14 C hervorgeht, bereits nach 20 min die maximale Spaltung erreicht ist und im zeitlichen Verlauf keine Intensitätszunahme der Spaltproduktbanden zu beobachten war.

Zusammenfassend konnte für alle unter 5.4 aufgeführten TypIII HHRz Motive *in vitro* anhand von gerichteten Spaltungsanalysen bei 37°C und 2 mM MgCl_2 , eine katalytische Aktivität nachgewiesen werden. Dabei wurde in allen Fällen eine deutliche Reduktion der Aktivität der G17 Mutante im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Anhand der kinetische Untersuchungen der Poly-C Loop-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die aktive Konformation des HHRz durch tertiäre Interaktionen zwischen den Loop1 und Loop2 Sequenzen stabilisiert.

5.4.3 Ligationsstudien der HHRz G17 Mutanten

Die Funktionalität der HHRz G17 Mutanten basiert auf der Fähigkeit der Religation der beiden Spaltprodukte zum *full length* Transkript. Die Herstellung der Spaltprodukte, erfolgte mittels T7 RNA Polymerase in einer radioaktiven *in vitro* Transkription und anschließender PAA-Gelaufreinigung. Die Spaltprodukte wurden in Spaltungspuffer gelöst und die Proben vereinigt. Durch Zugabe von 2 mM MgCl_2 wurde die Ligationsfähigkeit der beiden Spaltprodukte im Vergleich zum WT bei 37°C analysiert. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Ligationsanalysen der G17 Mutanten im Vergleich zum Wildtyp am Beispiel von PLMVd und Ara1 dargestellt.

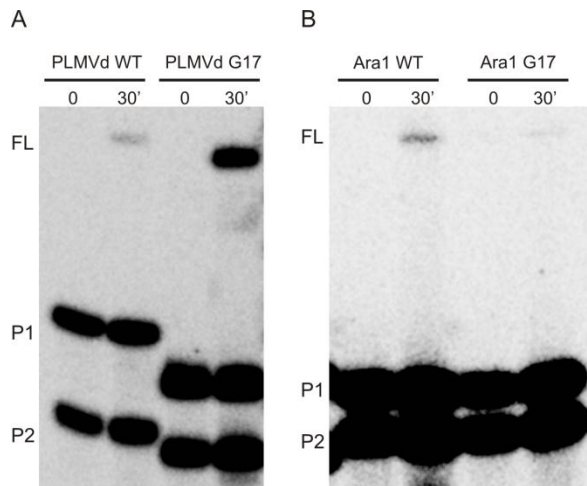


Abb. 5.15: Ligationsfähigkeit der G17 Mutanten im Vergleich zum WT

Analyse der Ligationsfähigkeit der PLMVd G17 (A) bzw. Ara1 (B) Mutante im Vergleich zum jeweiligen WT HHRz. Die Ligationen erfolgten bei 37°C und 2 mM MgCl₂. Die Gelbilder zeigen die Religation der Spaltprodukte P1 und P2 zum *full length* Transkript (FL) in Abhängigkeit von der Zeit und wurden nach einer Exposition von 18-24h mittels eines PhosphorImagers visualisiert.

Sowohl bei der PLMVd als auch bei der Ara1 Motiven konnte eine Religation der beiden Spaltprodukte zum *full length* Transkript beobachtet werden. Dabei zeigte die PLMVd G17 Mutante im Vergleich zum WT eine deutlich stärkere Ligationreaktion nach 30 min (Der Unterschiedliche Größe der Transkripte ist auf die Orientierung im Vektor und der damit verbundenen Linearisierung durch unterschiedliche Restriktionsenzyme zurückzuführen). Hingegen ist bei der Ara1 G17 Mutante ein deutlich schwächeres Signal auf der Höhe des *full length* Transkriptes zu beobachten. Bei den beiden anderen HHRz Motiven aus *X. tropicalis* (Xetr2 und 5) konnte unter diesen Versuchsbedingungen sowohl bei den G17 Mutanten als auch bei den WT Sequenzen keine Ligation der beiden Spaltprodukte beobachtet werden.

5.4.4 *In vivo* Analyse der Typ III HHRz Mutanten mittels dem β -Gal Reportersystems

Mit Hilfe eines von Stephan Wiegand (Wiegand, 2012) in der Arbeitsgruppe etabliertem β -Gal Reportersystems in dem eukaryotischen Einzeller *Dictyostelium discoideum*, konnte *in vivo* die katalytische Aktivität der unter 5.4.1 beschriebenen HHRz Motive unabhängig von der zugeführten Magnesiumkonzentration untersucht werden. Für die Herstellung des *lacZ* Expressionsvektors wurde die kodierende Sequenz des *lacZ* Gens aus *E. coli* genutzt, in den integrierenden pDneo2a Vektor kloniert und anschließend in *D. discoideum* transformiert.

Zur Untersuchung der Spaltungsaktivität wurden die verschiedenen HHRz Motive zwischen das Stop Codon und das PolyA Signal der β -Galaktosidase kloniert (s. Abb. 5.16). Dafür wurden die HHRz Motive mittels dem Restriktionsenzym *Xho*I aus dem pGEM[®]-T Easy Vektor verdaut und in den ebenfalls mit *Xho*I behandelten und dephosphorylierten pDneo2a *lacZ* Vektor umklontiert. Anschließend erfolgte per Elektroporation die Transformation von *D. discoideum* mit den Plasmiden.



Abb. 5.16: Darstellung des β -Galaktosidase Reporterkonstrukts für die Expression in *D. discoideum*

Die verschiedenen HHRz Motive wurden direkt nach dem Stop Codon aber vor dem PolyA Signal des β -Galaktosidase Gens fusioniert. Die Aktivität des β -Galaktosidase Gens steht unter der Kontrolle eines Actin-6 Promotors. Das eingezeichnete Oligonukleotid (PE pDneo2a β -Gal rev) zwischen dem HHRz Motiv und dem PolyA Signal diente in einem späteren Primer Extension Assay dem Nachweis der *full length* bzw. gespaltenen β -Gal mRNA.

Das Gen für β -Galaktosidase wird von einem für *D. discoideum* spezifischen Promotor gelesen und enthält zwischen dem Stop-Codon und dem PolyA Signal die HHRz Sequenzen. Eine katalytische Aktivität der Motive führt zum Verlust des PolyA Schwanzes und dementsprechend zum Abbau der β -Gal mRNA. Die Expression des lacZ Gens kann durch den enzymatischen Nachweis der β -Galaktosidase Aktivität mittels ONPG Assay analysiert werden. Dabei wird das Substrat ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid) durch die β -Galaktosidase zu Galaktose und dem lichtabsorbierenden Farbstoff o-Nitrophenol hydrolysiert, welcher photometrisch quantifiziert werden kann (Dingermann et al., 1989).

Für den ONPG Assay wurden 2×10^6 *D. discoideum* Zellen aus einer Schüttelkultur entnommen und wie unter 4.1.1 beschrieben behandelt. Die Messung der β -Gal Aktivität erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei einer Wellenlänge von 405 nm. Im Anschluss wurde die Gesamtproteinkonzentration im Bradford Assay bestimmt und zur quantitativen Analyse die Enzymaktivität nach Gleichung 3 (s. 4.1.1) berechnet. Diese definiert die Gesamtproteinmenge, welche nötig ist, um 1 nmol ONPG in einer Minute zu hydrolysieren. Die Ergebnisse der Enzymaktivität und die damit verbundene katalytische Aktivität der unterschiedlichen HHRz Motive sind in der folgenden Abbildung 5.17 dargestellt.

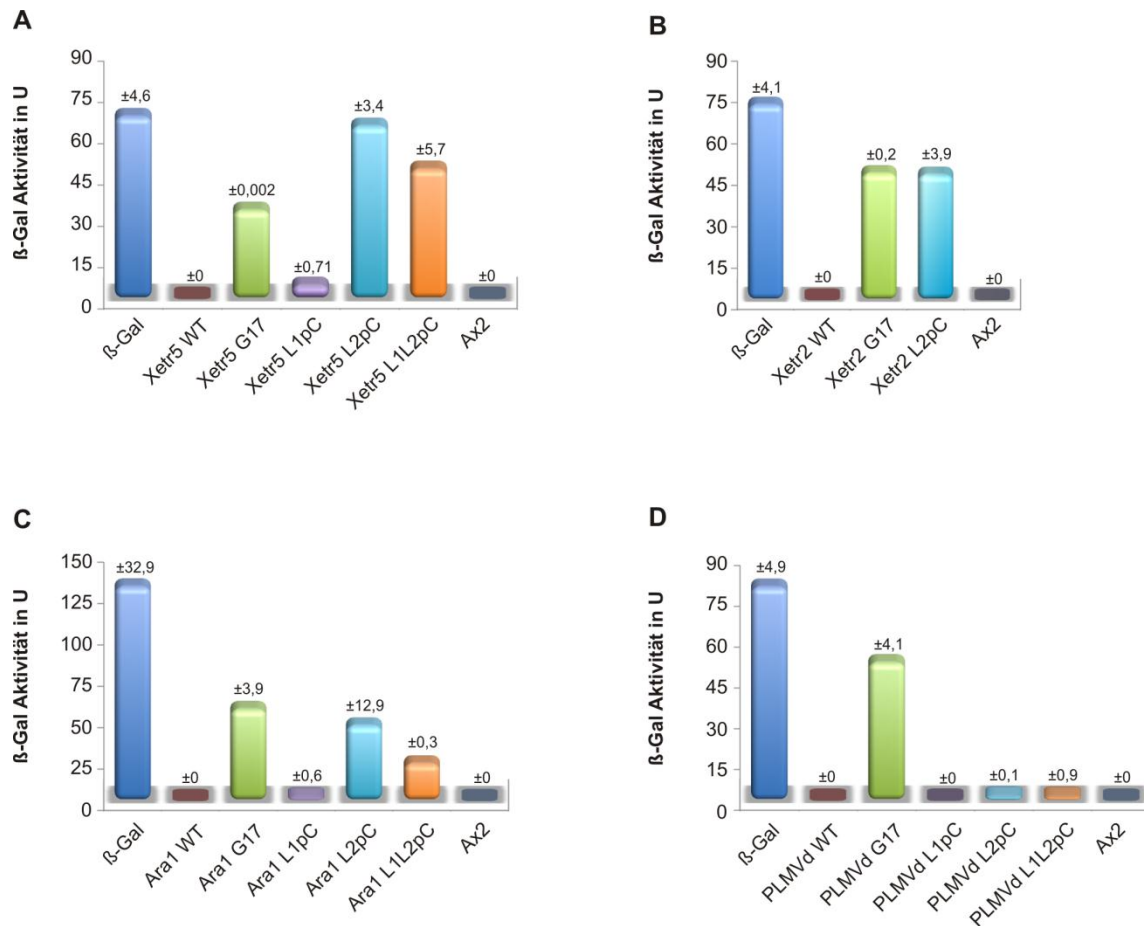


Abb. 5.17: β-Galaktosidase Assay zur Analyse der Spaltungsaktivität *in vivo*

Der Zellextrakt der verschiedenen mit den HHRz Motiven transformierten *D. discoideum* Zellen, wurde durch Verwendung von ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid) auf die β-Galaktosidase Aktivität untersucht. Die spezifische Aktivität ist in Unit (U in $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$) angegeben und gibt die Gesamtproteinmenge an, welche nötig ist, um 1 nmol ONPG in einer Minute bei 22°C zu hydrolysieren. Als Kontrolle diente ein β-Gal Expressionsstamm, in dem kein HHRz Motiv in die β-Gal mRNA fusioniert wurde (β-Gal), sowie der Wildtypstamm von *D. discoideum* (Ax2). Die Werte aus drei technischen Replikaten sind gemittelt und die Standardabweichungen sind als \pm -Werte über den Expressionsbalken dargestellt. **A** ONPG Assay zur Untersuchung der katalytischen Aktivität der Xetr5 Motive *in vivo*. **B** ONPG Assay zur Untersuchung der katalytischen Aktivität der Xetr1 Motive *in vivo*. **C** ONPG Assay zur Untersuchung der katalytischen Aktivität der Ara1 Motive *in vivo*. **D** ONPG Assay zur Untersuchung der katalytischen Aktivität der PLMVd Motive *in vivo*.

Alle analysierten HHRz Stämme zeigten *in vivo* im Vergleich zum Kontrollstamm (β-Gal) eine katalytische Aktivität, wobei deutliche Unterschiede in der Spaltung der exprimierten mRNA festgestellt werden konnten. In den HHRz Wildtyp Motiven zeigte sich die erwartete Aktivität, wodurch der PolyA-Schwanz abgespalten wurde und keine β-Gal Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte. Für die G17 Mutanten konnte erstmals, ähnlich wie in den *in vitro* Experimenten bei 2 mM MgCl_2 , eine deutlich verringerte Aktivität unter physiologischen Magnesiumkonzentrationen beobachtet werden. Wie aus den ONPG Assay hervorgeht liegt auch hier ein Großteil der β-Gal mRNA ungespalten vor und somit konnte die β-Galaktosidase das Substrat ONPG hydrolysieren. Die Poly-C Loop Mutanten der unterschiedlichen HHRz Motive verfügten unter physiologischen Bedingungen ebenfalls über

Spaltungsaktivität und spiegelten exakt die Ergebnisse der *in vitro* Experimente wieder. Interessanterweise zeigte sich dabei, dass die PolyC-Loop1 Konstrukte eine ähnliche Aktivität wie die Wildtyp HHRz Motive aufwiesen. Dagegen zeigten die PolyC-Loop2 Mutanten eine deutlich verringerte Spaltungsaktivität und folglich auch die L1L2pC Mutanten. Somit scheinen Teile der Loop2-Sequenz für eine starke Interaktion und der damit verbundenen Spaltungsaktivität verantwortlich zu sein.

5.4.5 Expressionsanalyse der β -Gal mRNA mittels Primer Extension Assay

Zum Nachweis der Spaltung der β -Gal mRNA *in vivo* wurde ein Primer Extension Assay (PE Assay) durchgeführt. Dafür wurde aus den verschiedenen HHRz Expressionsstämmen Gesamt-RNA isoliert, welche im ersten Schritt mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid bei 54°C hybridisiert wurde. Das Oligonukleotid (PE pDneo2a β -Gal rev) bindet wie in Abbildung 5.16 dargestellt zwischen dem PolyA Signal und dem HHRz Motiv. Mittels reverser Transkriptase wurde in einem zweiten Schritt das Oligonukleotid am 3'-Ende der vorhandenen mRNA verlängert. Dabei sollte es im Falle eines katalytisch aktiven HHRz an der Spaltstelle zum Abbruch der Transkription kommen und die in der Tabelle 5.6 angegebenen Transkripte detektiert werden.

Tab. 5.5: Erwartete Größen für katalytisch aktive HHRz Motive im PE Assay

HHRz	erwartetes Transkript (in nt)
Xetr2 WT/Mutanten	148
Xetr5 WT/Mutanten	128
Ara1 WT/Mutanten	91/85*
PLMVd WT/Mutanten	88

* Ara1 L2pC zeigte ein verkürztes Transkript durch fehlende *SacI* Schnittstelle am 3'-Ende des HHRz

Wie aus Abbildung 5.18 hervorgeht, konnte für alle HHRz Expressionstämmen die gespaltene β -Gal mRNA nachgewiesen werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich bei dem verwendeten Größenstandard um einen DNA Marker handelt. Dieser zeigt in einem denaturierenden PAA-Gel ein anderes Laufverhalten als ein RNA Marker und diente somit nur zu groben Abschätzung der Größen. Im als Kontrolle genutzten Expressionsstamm pDneo2a lacZ konnte das typische Bandenmuster für eine ungespaltene mRNA beobachtet werden. Hierbei verlängert die reverse Transkriptase das Oligonukleotid solange bis es zum Abbruch der Transkription durch verschiedene Parameter, wie RNA Strukturen, kommt und demzufolge zu unterschiedlich langen Transkripten führt.

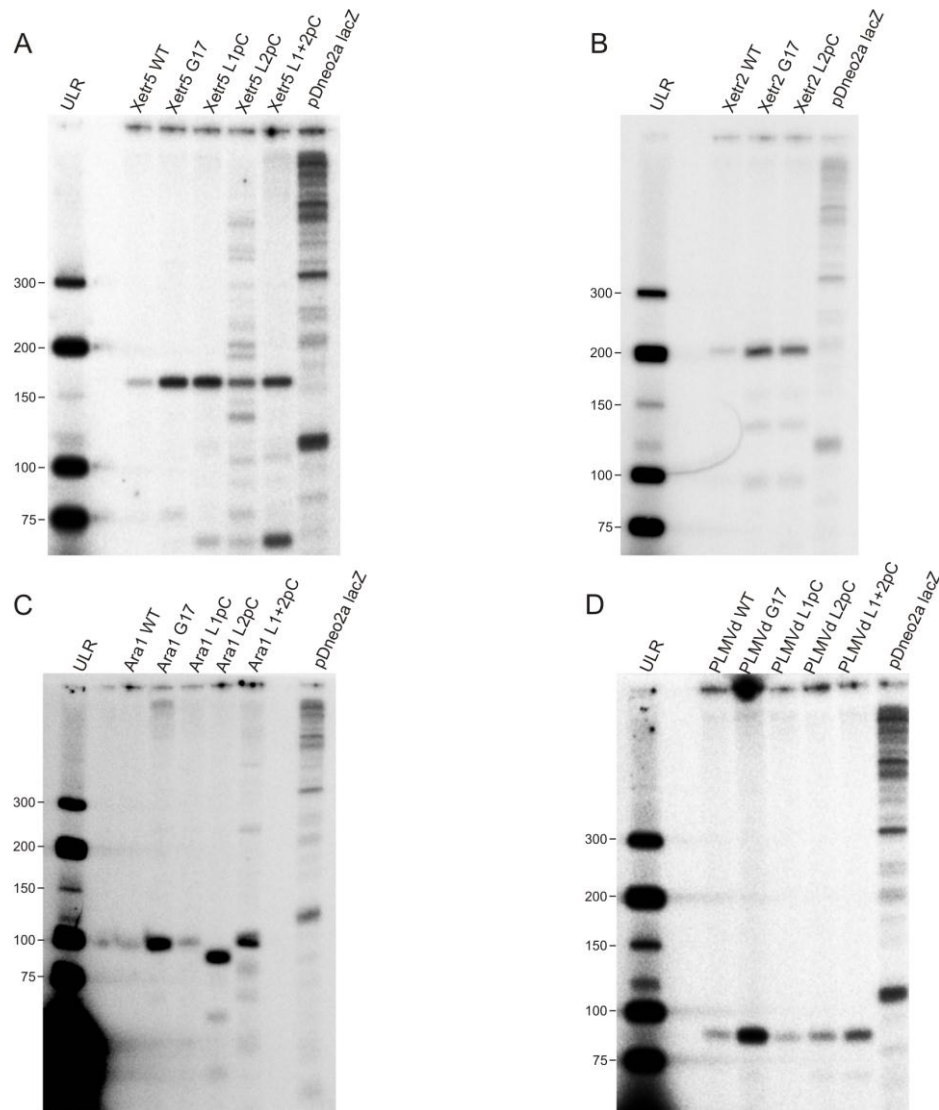


Abb. 5.18: Primer Extension Assay

Gesamt-RNA der verschiedenen Expressionsstämme wurde isoliert und mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid inkubiert, welches zwischen dem PolyA-Signal und dem HHRz bindet. Durch reverse Transkriptase wurde das Oligonukleotid am 3'-Ende bis zur Spaltstelle des HHRz verlängert. Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem 10%igem PAA-Gel und wurde nach einer Exposition von 48h mittels eines PhosphorImagers visualisiert. **A** Primer Extension Assay der Xetr5, **B** der Xetr2, **C** der Ara1 und **D** der PLMVd HHRz Konstrukte. Als Größenstandard wurde der zuvor radioaktiv markierte Marker GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (ULR) der Firma Fermentas verwendet.

Neben der gespaltenen β -Gal mRNA konnte insbesondere in den Expressionsstämmen der G17 Mutanten ein deutlich größeres Transkript nachgewiesen werden (s. Abb. 5.18 **C** Ara1 G17), welches vermutlich der ungespaltenen mRNA entspricht. Dies konnte in einem zusätzlichen PE Assay, wo ausschließlich die G17 Mutanten im Vergleich zum Wildtyp analysiert wurden nochmals bestätigt werden (Daten sind im Anhang A8 aufgeführt). Somit zeigte sich erneut, dass die HHRz G17 Mutanten zwar funktionell sind, aber eine deutlich geringere Aktivität als die WT HHRz aufweisen.

Tabelle 5.6 gibt zusammenfassend einen Überblick über die *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse der Spaltungsaktivitäten der untersuchten HHRz Motive.

Tab. 5.6: Zusammenfassung der *in vitro* und *in vivo* Spaltungsaktivität der einzelnen HHRz Motive

HHRz Motiv	Spaltungsaktivität		
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	
	k_{obs} -Wert (in min^{-1})	ONPG Assay (in %)	PE Assay
Xetr2 WT	0,74	100,0	+
Xetr2 G17	0,27	35,3	+
Xetr2 L1pC	0,26	36,0	+
Xetr5 WT	2,37	100,0	+
Xetr5 G17	0,16	51,7	+
Xetr5 L1pC	4,28	93,1	+
Xetr5 L2pC	0,10	5,3	+
Xetr5 L1L2pC	0,02	29,0	+
Ara1 WT	2,72	100,0	+
Ara1 G17	0,14	57,5	+
Ara1 L1pC	1,11	98,6	+
Ara1 L2pC	0,09	65,2	+
Ara1 L1L2pC	0,29	83,0	+
PLMVd WT	12,62	100,0	+
PLMVd G17	0,12	35,5	+
PLMVd L1pC	4,99	100,0	+
PLMVd L2pC	6,43	98,2	+
PLMVd L1L2pC	2,92	98,4	+

Im Vergleich der k_{obs} -Werte aus den *in vitro* Spaltungskinetiken und den erhaltenen Ergebnissen im ONPG Assay konnte *in vivo* eine ähnlich starke Aktivität der HHRz Motive beobachtet werden.

6. Diskussion

6.1 Experimentelle Validierung der Filterschritte

Anhand des von Carsten Seehafer (Seehafer, 2012) entwickelten Programms RNAhit konnten mit Hilfe des unter Abschnitt 2.5.1 beschriebenen struktur- und sequenzbasierten Deskriptors in öffentlich zugänglichen Datenbanken 623609 primäre Typ III HHRz identifiziert werden. Um in der Vielzahl der Treffer katalytisch aktive HHRz zu finden, wurde anschließend ein auf Sekundärstruktur und thermodynamischen Parametern basierendes Analyseprogramm (s. Abb. 2.8) entwickelt. Mit diesem Programm war es möglich, die primären Treffer auf 40112 potentiell katalytisch aktive Typ III HHRz zu reduzieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war unter anderem, diese Filtereinstellungen durch experimentelle Analysen der katalytischen Aktivität, zu bestätigen oder zu modifizieren. Die experimentelle Validierung der Filterschritte erfolgte mittels *in vitro* Spaltungsanalysen anhand verschiedener primärer Treffer aus *X. tropicalis*, *A. thaliana* und *A. lyrata*. Herangezogen wurden zwölf neu identifizierte Treffer aus *X. tropicalis*, drei aus *A. thaliana* und vier Treffer aus *A. lyrata*. Allen ausgewählten Treffern gemein war ein $\Delta G^0_{37^\circ\text{C}, \text{free}}$ -Wert von ≤ -10 kcal/mol, mit jedoch unterschiedlichen $\Delta\Delta G^0$ -Werten. Als Positivkontrolle diente das bereits als katalytisch aktiv getestete HHRz Ara1 aus *A. thaliana*. Der ΔG -Wert ist ein Maß für die thermodynamische Stabilität einer Molekülstruktur und somit, neben der Faltung in ein HHRz, eines der wichtigsten Filterkriterien bei der Suche nach katalytisch aktiven HHRz.

In *in vitro* Spaltungsanalysen in Anwesenheit von 2 mM MgCl_2 konnten für acht der insgesamt 19 analysierten HHRz in Abhängigkeit von der Zeit eine autokatalytische Aktivität beobachtet werden (s. Tab. 5.2). Dabei zeigten die HHRz Motive Xetr1, 2, 4, 5, 7 und 8 aus *X. tropicalis*, Arly3 aus *A. lyrata* und das als Positivkontrolle eingesetzte Ara1 Motiv die Spaltung des *full length* Transkripts in die beiden Spaltprodukte. Im Gegensatz zu den elf nicht spaltenden HHRz Motiven, verfügten alle aktiven HHRz über einen $\Delta\Delta G^0$ -Wert von 0 und ein Cytosin an Position 17 und 3 in der Core-Region, während die bei der Spaltung interagierenden Helices I und II kein Wobble-Basenpaar (G-U oder U-G) aufwiesen. Im Folgenden soll auf die einzelnen Filterschritte näher eingegangen und deren Bedeutung für ein katalytisch aktives HHRz erläutert werden. Ein $\Delta\Delta G^0$ -Wert von 0 bedeutet, dass sowohl die freie Faltung als auch die durch *Constrains* erzwungene Faltung der HHRz Motive zur Ausbildung der gleichen Sekundärstruktur führt. Sollte dieser Wert, wie bei Xetr3, Xetr6, Xetr9-12, Arly4 und Arth5 > 0 sein, muss bei der freien Faltung zur Ausbildung der typischen HHRz Struktur Energie zugeführt werden. Somit ist es wichtig, dass bereits die freie Faltung

des HHRz die typische Sekundärstruktur aufweist. Jedoch kann mittels RNAhit lediglich der $\Delta\Delta G^0$ -Wert aus der Differenz des $\Delta G^0_{37^\circ\text{C}, \text{motiv}}$ -Wertes und des $\Delta G^0_{37^\circ\text{C}, \text{free}}$ -Wertes berechnet werden und nicht ein auf der ausgebildeten Sekundärstruktur basierender Vergleich gemacht werden. Dadurch kann es auch wie in Abbildung 6.1 am Beispiel eines in *X. tropicalis* gefundenen Motivs zu falsch positiven Treffern kommen. Beide Sekundärstrukturen weisen einen ΔG^0 -Wert von -23,56 kcal/mol auf, was zu einem $\Delta\Delta G^0$ -Wert von 0 führt. Jedoch zeigt ein Vergleich der Sekundärstruktur keinerlei Übereinstimmung und resultiert wahrscheinlich in einem katalytisch nicht aktiven Ribozym.

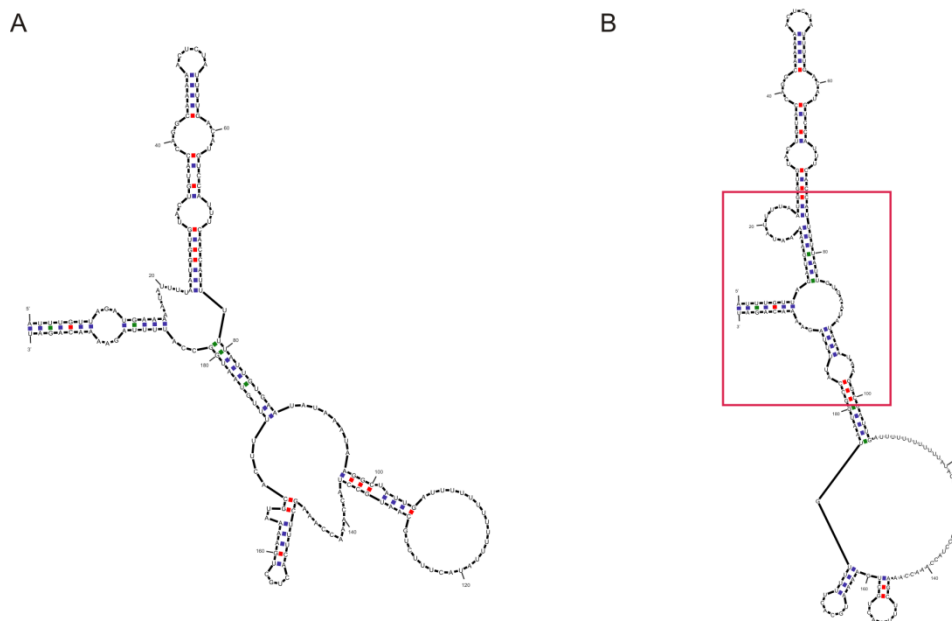


Abb. 6.1: Sekundärstrukturvergleich eines falsch positiven Treffers

Vergleich der erzeugten Sekundärstrukturen eines falsch positiven Treffers von *Xenopus tropicalis* scaffold_313:[254751,254553]. **A** Freie Faltung des HHRz Motivs mit dem Programm Mfold und einem daraus resultierenden $\Delta G^0_{37^\circ\text{C}, \text{free}}$ -Wertes von -23,56 kcal/mol. **B** Erzwungene Faltung in ein HHRz anhand folgender *Constrains*: P 85 0 4, P 190 0 3, F 9 83 4, F 1 199 6, F 91 189 4, mit einem sich ergebenden $\Delta G^0_{37^\circ\text{C}, \text{motiv}}$ -Wert von ebenfalls -23,56 kcal/mol. Das rote Rechteck markiert das erzwungene typische HHRz Motiv, welches bei der freien Faltung (A) trotz des identischen ΔG^0 -Wertes nicht beobachtet werden konnte.

Des Weiteren konnte bei allen in dieser Arbeit analysierten aktiven HHRz an Position 17 und 3 in der Core-Region ein Cytosin beobachtet werden. Dies scheint aber kein zwingendes Kriterium für die Suche nach katalytisch aktiven HHRz zu sein. Die Basen der Core-Region sind hochkonserviert und beeinflussen die katalytische Aktivität eines HHRz, jedoch konnte in zahlreichen Analysen auch mit anderen Basen an diesen Positionen eine Aktivität beobachtet werden (Perreault et al., 2011). Weiterhin zeigten *in vitro* Experimente, dass eine Veränderung des Basenpaares C₃G₈ in ein beliebig anderes Basenpaar lediglich zu einer verminderten selbstspaltenden Aktivität führt (Przybilski und Hammann, 2007). Auch bei Analysen der Minimalstruktur konnten unter hohen Magnesiumkonzentrationen (10 mM) Spaltungsaktivitäten verschiedener Core-Variationen beobachtet werden (Ruffner et al., 1990).

Somit scheint die Verallgemeinerung des Deskriptors an diesen Positionen gerechtfertigt. Ein weiteres in dieser Arbeit identifiziertes Kriterium eines selbstspaltenden Motivs, ist die Vermeidung von Wobble-Basenpaarungen in den Helices I und II. Keines der acht aktiven HHRz weist in den Helices I und II Wobble Basen auf. Nur beim Xetr4 Motiv konnten anhand der in der Datenbank hinterlegten Sequenz zwei Wobble Basenpaarungen in Helix III beobachtet werden (s. Anhang Abb. A3.2), welche aber auf die katalytische Aktivität des Ribozyms keine Auswirkungen hatten (s. Anhang Abb. A4.2). Wobble Basenpaarungen in den Helices I und II könnten die für die Spaltung notwendige Stabilisierung der parallelen Anordnung der Helices bzw. die über Pseudoknoten stattfindenden Interaktionen (Perreault et al., 2011) beeinflussen. Dies beruht auf der Tatsache, dass ein G-U oder U-G Basenpaar über zwei Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft ist und im Vergleich zum normalen Watson-Crick Basenpaar die Basen gegeneinander verschoben sind (Masquida und Westhof, 2000). Wenn die Inaktivität der HHRz ausschließlich auf den in den Helices I und II beobachtete Wobble Basenpaarungen beruht, müsste durch einen gezielten Austausch der Wobble Basen mit normalen Watson-Crick Basenpaaren die katalytische Aktivität wieder hergestellt werden können. So konnte im Rahmen der Diplomarbeit von Sara Völkel am Beispiel des Hyma34 Motivs aus *Hydra magnipapillata* gezeigt werden, dass ein Austausch des in Helix II befindlichen Wobble Basenpaares zu einem aktiven HHRz führt (Völkel, 2011). Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass die nötigen tertiären Interaktionen zwischen den Helices I und II bzw. zwischen den Loops1 und 2 infolge der verursachten Verschiebung der Basen durch die Wobble Paarung nicht mehr stattfinden können, wodurch die Spaltung unter physiologischen Magnesiumkonzentrationen gehemmt wird. So konnte bei den drei HHRz Motiven Arly2, Arly5 und Arth1 trotz eines $\Delta\Delta G^0$ -Wert von 0 und der typischen Ausbildung der HHRz Struktur in der freien Faltung keine Spaltung beobachtet werden. Somit sind, anhand der experimentellen Daten, für die Identifizierung von neuen HHRz folgende Filterkriterien zu beachten: Zunächst sollten alle Treffer mit einem $\Delta\Delta G^0$ -Wert > 0 und mit Wobble-Basenpaarung in den Helices I und II gefiltert werden. Des Weiteren wäre es von Vorteil, einen auf der ausgebildeten Sekundärstruktur basierenden Vergleich in die Analysepipeline zu integrieren, da die Funktionalität katalytischer RNAs nicht auf Sequenzähnlichkeiten, sondern auf der Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen beruht (Reeder und Giegerich, 2009). Letztendlich konnten unter Verwendung des neu definierten Analyseprogramms in *X. tropicalis* aus den anfänglichen 4976 primären Treffern noch sechs einzigartige, katalytisch aktive Treffer identifiziert werden, während aus den 988 primären *A. thaliana* Motiven nur die bereits bekannten Motive Ara1 und Ara2 (Przybilski et

al., 2005) und im Falle von *A. lyrata* nur eins von 1490 primären Ribozym-Motiven des Typ III heraus gefiltert wurden. Dabei wird deutlich, dass die Wahl des Deskriptors und der Analysepipeline entscheidend für die Erfolgsquote ist, denn je spezifischer ein sequenz- und strukturbasiertes Analyseprogramm gewählt wird, desto höher wird die Wahrscheinlichkeit katalytisch aktive HHRz unter den Treffern zu erhalten. Jedoch können dadurch HHRz mit Variationen in der Motivstruktur nicht gefunden werden. So konnten durch Nutzung verschiedenster Deskriptoren und Analyseprogramme in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer HHRz Motive von Typ I, II und III in bakteriellen und eukaryotischen Genomen entdeckt werden (Seehafer et al., 2011; de la Peña und Garcia-Robles, 2010b; Perreault et al., 2011; Jimenez et al., 2011). Die in dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Analysen zeigen jedoch, dass nicht jedes den Musterbeschreibungen entsprechende HHRz Motiv katalytische Eigenschaften besitzt und dass es einer spezifischen Filtereinstellung zur Identifizierung von aktiven HHRz bedarf.

6.2 Identifizierung der *Xenopus tropicalis* HHRz Motive auf genomischer Ebene

Durch die oben aufgeführte experimentelle Validierung der Filterschritte konnten im Organismus *X. tropicalis* 6 katalytisch aktive HHRz (Xetr1, 2, 4, 5, 7 und 8) identifiziert werden. Anhand der in der Datenbank hinterlegten Genomsequenz von *X. tropicalis* wurden die DNA Matrizen synthetisch über rekursive PCR hergestellt und in gerichteten Spaltungsexperimenten auf katalytische Aktivität hin analysiert. Die in öffentlichen Datenbanken hinterlegten Sequenzen beruhen in den meisten Fällen auf der Methode des sogenannten „shotgun sequencing“ (Schrotschuss-Sequenzierung; Venter et al., 1998). Dabei wird die DNA mehrfach kopiert und durch mechanische Scherkräfte (Ultraschall) in kleine Fragmente von etwa 1-2 kb zerteilt und sequenziert. Durch die Durchführung mehrerer Reads können auf einem computergestützten Programm Überlappungen einzelner Sequenzbereiche analysiert und Teile der Gesamtsequenz rekonstruiert werden. Jedoch ist dieses Verfahren fehleranfällig, da aufgrund von Amplifikations- und Sequenzierfehlern Basen falsch gelesen oder ausgelassen werden bzw. repetitive Sequenzen zu einem falschen *scaffold* (100 kb-10 Mb lange Nukleotidsequenzen, die auch Lücken enthalten können) zusammengeführt werden. Anhand dieser Problematik ist es notwendig, die in der Datenbank hinterlegten Sequenzen auch auf experimenteller Ebene zu identifizieren. Somit wurden, basierend auf den in den Datenbanken hinterlegten Sequenzmotiven für die 6 aktiven HHRz aus *X. tropicalis*, Oligonukleotide entworfen, die ca. 200 bp *upstream* und ca. 50 bp *downstream* des

eigentlichen HHRz Motivs binden (s. Abb. 5.5). Mit den so gewählten Oligonukleotiden konnten mittels PCR und anschließenden Sequenzierungen die HHRz Motive von Xetr1, 2, 5, 7 und 8 HHRz identifiziert werden, wobei lediglich Xetr2, 7 und 8 eine 100%ige Übereinstimmung im HHRz Motiv mit den in der Datenbank hinterlegten Sequenzen aufwiesen. Beim Xetr4 Motiv war es mit den gewählten Oligonukleotiden zunächst nicht möglich, die Ribozymsequenz in ihrer genomischen Umgebungssequenz zu amplifizieren, jedoch konnte mit HHRz spezifischen Oligonukleotidpaaren das Xetr4 Motiv im Genom von *X. tropicalis* identifiziert werden (s. Tab. 5.3). Die auf genomischer Ebene identifizierten HHRz Motive Xetr1, 4 und 5 wiesen T→C Transitionen im HHRz auf, wobei dies im Falle von Xetr1 zur Vergrößerung des Loop1 und bei Xetr4 zur Aufhebung der Wobble Basenpaarung in Helix III führte. Diese Veränderungen hatten jedoch *in silico* keinen Einfluss auf die Ausbildung der typischen Sekundärstruktur und somit wahrscheinlich auch nicht auf die autokatalytische Aktivität der Ribozyme. Anders stellte sich die Situation beim HHRz Xetr5 dar, wo die auf genomischer Ebene amplifizierte Sequenz in einer veränderten Sekundärstruktur resultierte, bei der es durch Verkürzung der Helix II zu einer Veränderung der Core-Region kam und somit wahrscheinlich keine Spaltungsaktivität mehr vorhanden ist. Diese Ergebnisse machen jedoch deutlich, dass die Wahl eines sehr spezifischen Deskriptors nicht unbedingt von Vorteil sein muss, da die experimentelle Identifizierung der Motive auf genomischer DNA Variationen der HHRz Sequenzen hervorbringen kann, welche nicht den in Datenbanken hinterlegten Sequenzen entsprechen. Insbesondere kann es, wie am Beispiel von Xetr4 gezeigt werden konnte, bei der *shotgun* Sequenzierung häufig zu Amplifikationsfehlern kommen und es entstehen Wobble Basenpaarungen die nicht der Realität entsprechen. Letztendlich käme es zum Ausschluss funktioneller Ribozyme aufgrund von Datenbankfehlern.

6.3 Funktionalität der HHRz Motive in ihrer natürlichen Umgebungssequenz

Die Funktionalität der HHRz Motive beruht zum einen auf der Expression der Ribozyme in der Zelle und zum anderen auf der Spaltungsaktivität in Abhängigkeit von divalenten Metall-Ionen. Zunächst erfolgte die Untersuchungen der Spaltungsaktivität in Abhängigkeit ihrer natürlichen Umgebungssequenz anhand der Motive Xetr7 und 8, da nur diese in der experimentellen Analyse, nach Klonierung und Sequenzierung, eine 100%ige Homologie zu den in der Datenbank hinterlegten Sequenzen hervorbrachten. Das Besondere dieser beiden Motive ist, dass sie beide auf dem Plusstrang von *scaffold_8* mit einem Abstand von ca. 4300 nt liegen und untereinander eine Sequenzhomologie von 99% aufweisen. Auch die,

mittels der Oligonukleotide amplifizierte, 200 nt *upstream* und 50 nt *downstream* liegende Umgebungssequenz beider Motive weist einen hochkonservierten Konsensusbereich auf, der zu 99% identisch ist. Anhand der in der Datenbank hinterlegten Sequenzen zeigte sich sogar, dass sich der Konsensusbereich über eine Gesamtlänge von 826 nt erstreckt. Bei Spaltungsanalysen dieser beiden Ribozym Motive in ihrer genomischen Umgebungssequenz stellte sich heraus, dass die *full length* Transkripte nicht wie erwartet in die beiden Spaltprodukte zerfallen, sondern in Abhängigkeit von der Zeit zusätzliche sehr spezifische Produkte entstehen. Nach einer genaueren Analyse der Sequenzmotive konnten in beiden Fällen, neben den bereits bekannten Typ III HHRz, jeweils noch zwei Typ III und zwei Typ I HHRz identifiziert werden, die mittels der unter 2.5.1 beschriebenen Datenbanksuche nicht gefunden werden konnten. Dies beruht darauf, dass die gewählte Musterbeschreibung nur nach Typ III HHRz mit einer variablen Loop Sequenz von einer Länge bis 100 nt sucht und überlappenden Treffer herausgefiltert werden. Somit wurden die zusätzlichen Typ I HHRz, die HHRz III (1) Motive mit einer Loop1 Größe von 216 nt und die HHRz III (2) Motive, welche mit den bereits bekannten HHRz III Motiven Xetr7 bzw. 8 in 6 nt überlappen, nicht identifiziert (s. Abb. 5.7). Im Falle von Xetr7 sind 4 der 5 Ribozyme katalytisch aktiv und resultieren in den in Abbildung 5.6 dargestellten Spaltungsprodukten. Hingegen konnte in der Konsensussequenz von Xetr8 zunächst nur eine selbstspaltende Aktivität bei den drei Typ III HHRz beobachtet werden. Für das HHRz I (1) Motiv aus der Konsensussequenz von Xetr7 und 8 konnte eine 100%ige Sequenzhomologie beobachtet werden, jedoch war es anhand des unter 5.2.2 beschriebenen Experimentes nicht möglich, eine Aussage über die katalytische Aktivität des Motivs zu machen, da dieses über eine gemeinsame Spaltstelle mit einem Typ III HHRz verfügt. Eine Einzelanalyse des HHRz I (1) bestätigte jedoch dessen katalytische Aktivität. Die Tatsache, dass das zweite Typ I HHRz (HHRz I (2)) aus der Konsensussequenz von Xetr8 nicht katalytisch aktiv ist, kann mehrere Ursachen haben. Zum einen ist bekannt, dass Typ I HHRz deutlich langsamer spalten als Typ III HHRz (Stix, 2011) und somit könnte die Inkubationszeit von 3h mit 2 mM MgCl₂ nicht ausreichend gewesen sein. Zum anderen zeigt dieses Typ I HHRz, verglichen mit dem katalytisch aktiven HHRz I (1) aus der Konsensussequenz von Xetr7, eine Fehlpaarung (U-U) in Helix I und ein um eine Base vergrößerten Loop2. Dadurch könnte die für die katalytische Aktivität notwendige Annäherung von Helix I und II und die damit verbundenen tertiären Interaktionen zwischen Loop1 und 2 nicht zustande kommen, woraus eine verlangsamte oder nicht vorhandene Spaltungsaktivität resultiert.

Wie bereits oben erwähnt, ist es für die Funktionalität eines Ribozyms nicht nur erforderlich die katalytische Aktivität *in vitro* zu untersuchen, sondern auch dessen Expression und Aktivität in der Zelle. Durch einen S1 Nuklease Protektionassay konnte in dieser Arbeit eine Expression der HHRz enthaltenden Konsensussequenz von Xetr7 und Xetr8 in verschiedenen Geweben (Ei, Muskel (Bein) und Leber) aus *X. tropicalis* beobachtet werden, wobei in keinem Gewebe eine katalytische Aktivität nachweisbar war. Dies bedeutet jedoch nicht zwingend, dass die verschiedenen HHRz Motive aus der Konsensussequenz von Xetr7 und Xetr8 intrazellulär nicht aktiv sind. Denn aufgrund der Tatsache, dass *X. tropicalis* kein typischer Modellorganismus ist und eine lange Generationszeit hat, stand lediglich das Material eines adulten *X. tropicalis* Weibchens zur Verfügung. Die Expression und katalytische Aktivität konnte daher in einer Vielzahl der Gewebe nicht untersucht werden bzw. ließen schlecht reproduzierbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt) keine eindeutige Aussage zu. Des Weiteren konnte nach einer Exposition von 48h nur eine sehr schwache Expression des *full length* Transkriptes beobachtet werden. Demzufolge liegen mögliche gespaltene Transkripte eventuell unter der Nachweisgrenze dieser Methode, oder sie werden in der Zelle schnell abgebaut. Ähnliche Schlussfolgerungen könnten auch anhand einer vergleichbaren Methode zum Expressionsnachweis, dem Northern Blot, getroffen werden. Hierbei sollten mindestens 0,1% der gesuchten RNA-Spezies in 5-20 µg Gesamt-RNA enthalten sein, um eindeutig nachgewiesen werden zu können (Voit, in Lottspeich und Engels (Hrsg.), Bioanalytik, 2009). Doch mit dieser Methode konnte nicht einmal das *full length* Transkript nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wäre es möglich, dass die Ribozymdomäne nur in Verbindung mit einem Protein-Co-Faktor Spaltungsaktivität aufweist, ähnlich wie bei RNase P (Altman et al., 1993). So konnte in *X. tropicalis* und in vielen weiteren Eukaryoten, in denen auch Typ I HHRz existieren, NORA-Homologe gefunden werden. Das Protein NORA (*Newt Ovary Ribozyme Associated Protein*) ist spezifisch in Ovarien des Molches *Triturus vulgaris* exprimiert und kann Ribozymmonomere binden (Denti et al., 2000). Des Weiteren wurde in Zellextrakten aus Oozyten von *Triturus vulgaris* in *in vitro* Experimenten *trans*-Spaltung gezeigt, dabei kommt das Ribozymtranskript als RNP in einem Komplex mit Proteinen vor (Luzi et al., 1997). Die *trans*-Spaltung erfolgt in den meisten Fällen nach einer intramolekularen Spaltung des HHRz, wobei das Spaltprodukt an eine Ziel-RNA binden kann und dann als *trans*-spaltendes Ribozym im Komplex mit Proteinen an der Prozessierung von RNA-Molekülen beteiligt sein könnte. Jedoch sind sowohl die biologische Funktion des HHRz aus dem Molch, als auch die Bestandteile des Proteinkomplexes unbekannt. So könnten Bindungsstudien in Form von EMSA (*Electro*

Mobility Shift Assay) zeigen, ob diverse HHRz aus den unterschiedlichsten Organismen an die NORA-Homologe binden können und dadurch katalytische Aktivität besitzen. Beruhend auf der in *in vitro* Experimenten gezeigten katalytischen Aktivität der verschiedenen HHRz in der Konsensussequenz von Xetr7 und Xetr8, wäre auch eine Form des alternativen Spleißens denkbar. Dabei könnte durch die Aktivität der verschiedenen HHRz, in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, ein Teil der Sequenz herausgespalten werden. Anschließend wäre es denkbar, dass aufgrund der starken Homologie der einzelnen Ribozym Motive der verbleibende Teil wieder religieren und mit den so entstandenen Hybrid RNA Molekülen die Genexpression beeinflusst werden kann.

6.3 *In vitro* und *in vivo* Spaltungsanalysen verschiedener Typ III HHRz Mutanten

Die Ausbildung der katalytisch aktiven Form eines HHRz beruht auf tertiären Interaktionen zwischen den Loops1 und 2 bzw. Helices I und II. Wie in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte, erhöhen diese tertiären Interaktionen die Aktivität natürlich vorkommender HHRz und senken die Abhängigkeit der Magnesiumkonzentrationen auf einen in der Zelle vorhandenen physiologischen Wert (Khvorova et al., 2003; de la Peña et al., 2003; Penedo et al., 2004; Przybilski et al., 2005). Dies beruht auf der Tatsache, dass die verkürzte Minimalstruktur ohne Loop Strukturen nur unter nicht physiologischen Magnesiumkonzentrationen (10 mM) Aktivität zeigte (Bassi et al. 1996; Uhlenbeck, 1987). Des Weiteren spielen die hochkonservierten Nukleotide der Core-Region eine entscheidende Rolle bei der Spaltungsfähigkeit eines HHRz. Dabei ist die Bildung eines Basenpaares zwischen Nukleotid 3 und 8 (N3N8), sowie ein Guanin an Position 5 und ein Adenin an Position 15 für die katalytische Aktivität der HHRz entscheidend (Ruffner et al., 1990; Przybilski und Hammann, 2007). Weiterhin ist die Spaltstelle basierend auf Aktivitätsanalysen der Minimalsequenz durch ein H (d.h. A, C oder U, aber kein G) an Position 17 definiert. Denn im Falle eines Guanins an Position 17 würde es zu einer Basenpaarung mit dem an Position 8 befindlichen Cytosin kommen, wodurch die Spaltstelle blockiert würde und keine aktive HHRz Konformation ausgebildet werden kann (Ruffner et al., 1990). Unter dieser Voraussetzung sollte die G17 Mutante zunächst als interner Größenstandard für das WT Motiv in der *in vitro* Transkription dienen. Dies sollte es erlauben, besser zwischen nicht gespaltenen und vollständig gespaltenen Transkripten, die lediglich einen Größenunterschied von 6-10 nt aufwiesen, zu unterscheiden. Entgegen aller Erwartungen konnte, wie aus Abbildung 5.3 am Beispiel der Xetr1 Motive deutlich wird,

nicht nur in den WT Motiven eine katalytische Aktivität beobachtet werden, sondern auch in den entsprechenden G17 Mutanten. Jedoch resultieren diese Beobachtungen aus den Versuchsbedingungen der *in vitro* Transkription mit einer Magnesiumkonzentration von 5 mM. Basierend auf diesen Ergebnissen und Experimenten wurde anhand verschiedener Typ III HHRz Mutanten der Einfluss der veränderten Core-Region bzw. der interagierenden Loop Bereiche auf die katalytische Aktivität in gerichteten *in vitro* Spaltungsanalysen mit 2 mM MgCl₂ untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die HHRz G17 Mutanten der Xetr2, Xetr5, Ara1 und PLMVd Motive im Vergleich zum jeweiligen WT eine deutliche Inhibierung der Spaltung zeigten, aber dennoch katalytisch aktiv waren. Somit lagen die Spaltungseffizienzen der G17 Mutanten bei nur etwa 30-50% und verglichen mit den Effizienzen der WT Sequenzen von 75-95%, konnte nur etwa die Hälfte der *full length* Transkripte gespalten werden. Eine mögliche Erklärung für die deutlich geringeren Spaltungseffizienzen der G17 Mutanten könnte die damit zusammenhängende Ausbildung des G17C3 Basenpaares sein und dessen Einfluss auf die Bildung des für die katalytische Aktivität erforderlichen C3G8 Basenpaares. So konnte bereits in vorherigen Studien gezeigt werden, dass eine Basenpaarung zwischen Position 3 und 8 im katalytischen Kern für die Aktivität der HHRz entscheidend ist (Przybilski und Hammann, 2007). Hier führte ein Austausch des C3G8 durch ein G3C8 Basenpaares zu ähnlichen niedrigen Spaltungseffizienzen wie bei den G17 Mutanten, da auch in diesem Fall eine Basenpaarung zwischen G3 und C17 möglich wäre. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass unabhängig von den tertiären Interaktionen der Loop und Helix Bereiche die Spaltungseffizienz in Abhängigkeit der Core-Nukleotide deutlich gesenkt werden kann. Weiterhin wäre denkbar, dass die Ligationsreaktion in Abhängigkeit der veränderten Core-Region begünstigt wird und es dadurch zur unvollständigen Spaltung kommt. So konnte an der PLMVd G17 Mutante im Vergleich zum WT bei 2 mM MgCl₂ eine deutlich stärkere Ligation nach 30 min beobachtet werden, was zum einen für die Funktionalität des Motivs spricht und zum anderen die Annahme einer begünstigten Ligationsreaktion verstärkt. Jedoch konnte der Effekt bei den anderen analysierten G17 Mutanten nicht beobachtet werden, was unter Umständen auf die Versuchsbedingungen zurückzuführen sein kann. Anhand der hier erhaltenen Ergebnisse für die Funktionalität der G17 Mutante konnten diese Varianten auch in einer von Carsten Seehafer durchgeführten Datenbanksuche, welche sich auf die drei Organismen *X. tropicalis*, *A. thaliana* und *S. mansoni* beschränkte, identifiziert werden. Dabei konnten in *S. mansoni* sieben und in *X. tropicalis* und *A. thaliana* jeweils ein natürlich vorkommendes HHRz Motive mit einem Guanin an der Spaltstelle beobachtet werden, wobei alle die für die katalytische Aktivität

erforderlichen Filterkriterien erfüllen. Somit scheinen diese Motivvariationen der HHRz ähnlich häufig in den verschiedensten Organismen vorzukommen wie die C17 Motive und mit ihrer verringerten katalytischen Aktivität eine besondere Rolle in der Zelle zu spielen.

Die Analyse der tertiären Interaktionen über nicht Watson-Crick Basenpaare erfolgte anhand der unter 5.4.1 beschriebenen PolyC-Loop Mutanten in *in vitro* Spaltungskinetiken. Damit konnte gezeigt werden, dass die natürlichen Loop Sequenzen des WT im Vergleich zu den C-Loop Mutanten der verschiedenen Motive nicht denselben Einfluss auf die Spaltungsaktivitäten haben. Jedoch konnte in allen untersuchten Mutanten eine katalytische Aktivität nachgewiesen werden. So scheint nur im Falle der Xetr5 L1pC Mutante der PolyC-Loop1 mit den WT-Loop2 stabilere tertiäre Interaktionen auszubilden, wodurch die Spaltung des *full length* Transkripts fast doppelt so schnell wie beim WT ist (s. Abb. 5.13). Jedoch konnten diese Ergebnisse unter physiologischen Bedingungen nicht bestätigt werden. Generell können die Ergebnisse der *in vitro* Analyse der katalytischen Aktivität der HHRz nur als Richtwerte angesehen werden, da in unabhängig voneinander durchgeführten Spaltungskinetiken nicht immer die gleichen Ergebnisse erzielt werden konnten. So scheint der gesamte Prozess der *in vitro* Kinetiken sehr anfällig auf methodische Fehler zu sein und ist zum anderen abhängig von der eingesetzten Magnesiumkonzentration. Beruhend auf dieser Tatsache zeigte sich auch eine Aktivität der Ara1 C-Loop Mutanten, welche bereits zuvor in ähnlichen *in vitro* Experimenten als nicht katalytisch aktive HHRz beschrieben wurden (Przybilski et al., 2005). Um diese Fehler zu minimieren und eine Aussage über die Aktivität unter physiologischen Bedingungen in der Zelle treffen zu können, wurde für diese Untersuchungen ein in der Arbeitsgruppe etabliertes β -Gal Reportersystem in der Amöbe *Dictyostelium discoideum* genutzt (Wiegand, 2012). Dabei wurden die verschiedenen HHRz Motive zwischen das Stop Codon und das PolyA Signal des *lacZ* Gens kloniert. Das Gen für die β -Galaktosidase wird dabei von einem *D. discoideum* spezifischen Promotor gelesen und führt bei katalytischer Aktivität der HHRz Motive zum Verlust des PolyA Schwanzes und somit zum Abbau der β -Gal mRNA. Die enzymatische Aktivität der β -Galaktosidase konnte photometrisch in einem ONPG-Assay analysiert werden, in dem das Substrat ONPG zu Galaktose und den lichtabsorbierenden Farbstoff o-Nitrophenol hydrolysiert wurde. In diesem Experiment konnte ähnlich wie in den *in vitro* Spaltungskinetiken für alle untersuchten HHRz unter physiologischen Bedingungen eine katalytische Aktivität festgestellt werden und die bereits veröffentlichten Ergebnisse für die Ara1 C-Loop Mutanten (Przybilski et al., 2005) nicht bestätigt werden. Für die G17 Mutanten konnte auch *in vivo* eine deutlich geringere Aktivität im Vergleich zum WT Motiv beobachtet werden. Auffällig bei den PolyC-Loop1

Mutanten ist, dass sie alle eine ähnliche Aktivität wie der WT besitzen und somit durch die Cytosine des Loop1 die Interaktion mit dem WT Loop2 Nukleotiden nicht beeinflusst wird, während die PolyC-Loop2 Mutanten eine deutlich verringerte Aktivität aufweisen. Es ist anzunehmen, dass die Substitution der Loop2 Nukleotide zu Cytosinen die Interaktion mit Loop1 verringert, wodurch den WT Nukleotiden in Loop2 eine für die katalytische Aktivität entscheidende Rolle zukommt. Lediglich bei den PLMVd C-Loop Mutanten konnte kein nennenswerter Unterschied im Vergleich zum WT festgestellt werden. Somit sprechen die Ergebnisse deutlich für die Ausbildung von individuellen tertiären Interaktionen zwischen den Loop1 und Loop2 Sequenzen, wodurch die aktive Konformation des HHRz stabilisiert wird. Weiterhin wäre es auch denkbar, dass sich zur Stabilisierung dieser Konformation tertiäre Interaktionen zwischen den Helices I und II ausbilden und nicht nur die Interaktionen der Loop Sequenzen entscheidend für die katalytische Aktivität und Spaltungsgeschwindigkeit ist. So könnten in einem Experiment durch einen Austausch der helikalen Bereiche zwischen den einzelnen HHRz Motiven bzw. durch gezielte Basenpaaraustausche in den Helices der Einfluss dieser auf die Spaltungsgeschwindigkeiten untersucht werden. Somit könnte gezeigt werden, ob unabhängig von den Loop Sequenzen, speziell im Fall von PLMVd, tertiäre Interaktionen zwischen den Helices ausschlaggebend für die aktive Konformation sind. In ähnlichen Experimenten konnten bereits von Przybilski und Hammann am Beispiel von PLMVd und Ara1 durch Austausch der WT Loop1 und 2 Sequenzen bzw. der Loop Sequenzen in Kombination mit den helikalen Bereichen der beiden HHRz Motive eine Abhängigkeit in Bezug auf die katalytische Aktivität gezeigt werden (Przybilski und Hammann, 2007). Dabei stellte sich heraus, dass ein Austausch der Loop Regionen von Ara1 mit denen von PLMVd nur einen geringen Einfluss im Vergleich zum WT Ara1 Motiv haben, hingegen aber der Austausch der kompletten Helices inklusive der Loop Bereiche von PLMVd zu einer deutlich stärkeren Aktivität führt, ähnlich der des WT PLMVd Motivs. Diese Ergebnisse und die hier erhaltenen Ergebnisse des ONPG Assays bestärken die Annahme von zusätzlichen tertiären Interaktionen zwischen den Helices I und II bei den verschiedenen PLMVd Motiven.

6.5 Herkunft und Funktion der HHRz

Nach all diesen Ergebnissen stellt sich nun die Frage nach Herkunft und Funktion der HHRz. Wie bereits in verschiedenen Suchen bestätigt werden konnte, existieren eine Vielzahl genomisch codierter Ribozyme. Auffällig ist, dass die Hammerhead Ribozyme, verglichen mit den drei weiteren Ribozym-Klassen, am häufigsten vorkommen und die verschiedenen

HHRz Typen in allen Bereichen des Lebens, allerdings mit deutlich verschiedenen Häufigkeiten, zu finden sind (Barrick et al., 2004; Gräf et al., 2005; Jimenez et al., 2011; Perreault et al., 2011; de la Peña und Garcia-Robles 2010a und 2010b; Seehafer et al., 2011). So sind HHRz in Genomen von Viren und Archaeen relativ selten. In den Archaeen (*Sulfolobus tokodaii*, *Sulfolobus islandicus*, *Nitrosopumilus maritimus* und *Archaeoglobus fulgidus*) konnten lediglich 8 verschiedene HHRz identifiziert werden, wobei diese die oben aufgeführten Filterkriterien mit einem $\Delta\Delta G^0$ -Wert > 1 nur bedingt erfüllen und demzufolge vermutlich nicht über eine katalytische Aktivität verfügen. Somit scheint es eher unwahrscheinlich, dass die heutigen HHRz Motive aus einer RNA Welt entstanden sind, da sie im letzten gemeinsamen Vorfahren, vor der Diversifizierung in die drei Reiche des Lebens, nicht zu finden sind. Weiterhin sind die Motive abgesehen von dem katalytischen Core relativ heterogen, sowohl in Sequenz als auch in der Länge. Aufgrund dieser Vielfältigkeit ist aus entwicklungsgeschichtlicher Sicht eher eine unabhängige Entstehung der HHRz wahrscheinlich. Für diese Theorie sprechen auch die von Salehi-Ashtiani und Szostak durchgeführten SELEX Experimente (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), mit denen gezeigt werden konnte, dass unter physiologischen Bedingungen aus einer Zufallssequenz ein HHRz entstehen kann. Des Weiteren spricht für die Hypothese der unabhängigen Entwicklung, dass viele Sequenzen in einem Organismus nur einmal vorkommen und im Vergleich der einzelnen Treffer mit anderen HHRz der gleichen Familie oftmals keine Homologie beobachtet werden konnte. So konnte in *A. lyrata* nur eins der beiden HHRz aus *A. thaliana*, mit einer 99%igen Homologie zu Ara1 und in einem anderen genomischen Kontext, gefunden werden. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für die 6 Typ III HHRz aus *X. tropicalis* gemacht werden, wo lediglich das Xetr4 Motiv mit einem etwas verlängerten Loop1 in *X. leavis* identifiziert werden konnte (Eikmeier, 2011). Diese Diversität der einzelnen HHRz erschwert die Suche nach der biologischen Funktion eines HHRz, da unterschiedliche Motive gleiche Funktionen übernehmen können und ebenfalls gleiche HHRz in verschiedene Organismen unterschiedliche Funktionen haben könnten. Unter diesen Aspekt sind die Ergebnisse einer weiteren Suche von Carsten Seehafer sehr auffällig, da durch eine Verlängerung der Loop1 Sequenz auf 100-1000 Nukleotide 60 Treffer in *X. tropicalis* gefunden werden konnten, wovon 57 sich lediglich in der Loop Sequenz unterscheiden und ansonsten im HHRz Motiv eine 99%ige Homologie zu dem Xetr2 Motiv aufweisen. Durch den vergrößerten Loop1 wäre eine Funktion als Riboschalter denkbar, da dadurch der Loop1 als Liganden-bindende Domäne (Aptamerdomäne) fungieren könnte, wobei das HHRz Motiv an sich die Expressionsplattform darstellt und somit die

Genexpression in Abhängigkeit des Liganden beeinflusst werden könnte (Lee et al., 2004). Somit könnte durch Bindung eines Liganden die Selbstspaltung des HHRz katalysiert oder gehemmt werden. Jedoch müssten zunächst anhand von Sequenzähnlichkeiten solche Liganden-bindenden Domänen in den verschiedenen Treffern identifiziert werden, um in späteren Experimenten, z.B. durch Isothermale Titrationskalorimetrie (*Isothermal Titration Calorimetry*, ITC; O'Brien et al., 2001) den Einfluss des Liganden auf die Aktivität des Ribozyms zu untersuchen.

Für die funktionelle Charakterisierung der HHRz ist ebenfalls der genetische Lokus entscheidend. So konnten die meisten Treffer in repetitiven Sequenzen, in Introns protein-codierender Gene und in intergenischen Bereichen identifiziert werden. Die HHRz in repetitiven Sequenzen sprechen für den Einbau durch mobile genetische Elemente und solche Motive konnten häufig z.B. in *Danio rerio* und *Schistosoma mansoni* identifiziert werden. Weiterhin könnte dies im Zusammenhang mit Retrotransposons stehen, wodurch die HHRz der Prozessierung von SINES (*short interspersed nuclear elements*) dienen und diese in Monomere spaltet, ähnlich der bei Retroviren bekannten *rolling circle* Replikation (Hammann et al., 2012). Auch wäre denkbar, dass HHRz in transposablen Elementen die Produktion von piRNA (*Piwi interacting RNA*) und anderen kleinen RNAs beeinflussen. In intergenischen Bereichen können sie, wie von de la Peña, Garcia-Robles und Perreault in Bakterien beobachtet wurde, in Zusammenhang mit Bakteriophagen DNA stehen und die Integration dieser ermöglicht haben (de la Peña und Garcis-Robles, 2010b; Perreault et al, 2011). In Introns können *trans* agierende regulatorische RNA Motive der exakten Prozessierung der miRNA dienen (Kim und Kim, 2007) oder das alternative Spleißen kontrollieren (de la Peña und Garcis-Robles, 2010a). Diese und die möglichen Funktionen im oberen Abschnitt dieser Arbeit geben nur einen kleinen Einblick in die Vielfältigkeit der HHRz und lassen noch viele Fragen offen, so dass die Suche nach der biologischen Funktion der verschiedenen HHRz bzw. nach weiteren Motivvariationen noch viele Entdeckungen versprechen lässt.

7. Literatur

Avery, OT, Macleod, CM, McCarty, M, (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine* 79 (2), 137-158.

Bachellerie, JP, Cavaillé, J, Hüttenhofer, A, (2002). The expanding snoRNA world. *Biochimie* 84, 775-790.

Barrick JE, Corbino KA, Winkler WC, Nahvi A, Mandal M, Collins J, Lee M, Roth A, Sudarsan N, Jona I, Wickiser, JK, Breaker, RR, (2004). New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proceedings of the national academy of sciences* 101, 6421-6426.

Bartel, DP, (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.

Bassi GS, Murchie AI, Lilley DM, (1996). The ion-induced folding of the hammerhead ribozyme: core sequence changes that perturb folding into the active conformation. *RNA* 2,756-768.

Bassi, GS, Murchie, AI, Walte,r F, Clegg, RM, Lilley DM, (1997). Ion-induced folding of the hammerhead ribozyme: a fluorescence resonance energy transfer study. *EMBO journal* 16, 7481-7489.

Beattie, TL, Olive, JE, Collins, RA, (1995). A secondary-structure model for the self-cleaving region of Neurospora VS RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (10), 4686-4690.

Birikh, KR, Heaton, PA, Eckstein, F, (1997). The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *European Journal of Biochemistry* 245, 1-16

Birnboim, HC, (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in enzymology* 100, 243-255.

Birnboim, HC und Doly, J, (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.

Bradford, MM, (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Buzayan, JM, Gerlach, WL, Bruening, G, (1986). Satellite tobacco ringspot virus RNA: A subset of the RNA sequence is sufficient for autolytic processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83, 8859-8862.

Canny, MD, Jucker, FM, Kellogg, E, Khvorova, A, Jayasena, SD, Pardi, A, (2004). Fast cleavage kinetics of a natural hammerhead ribozyme. *Journal of the American Chemical Society* 126, 10848-10849.

- Chomczynski, P und Sacchi, N, (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162, 156-159.
- Cornish-Bowden, A, (1985).** Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. *Nucleic acids research* 13, 3021–3030.
- Crick, FH, (1966).** The genetic code - yesterday, today, and tomorrow. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 31, 1-9.
- Crick, FH, (1970).** Central dogma of molecular biology. *Nature* 227(5258), 561-563.
- Cech, TR, Zaug, AJ, Grabowski, PJ, (1981).** In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 27,487-496.
- de la Peña, M, Gago, S, Flores, R, (2003).** Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *EMBO Journal* 22, 5561-5570.
- de la Peña, M und Garcia-Robles, I, (2010a).** Intronic hammerhead ribozymes are ultraconserved in the human genome. *EMBO report* 11, 711-716.
- de la Peña, M und Garcia-Robles, I, (2010b).** Ubiquitous presence of the hammerhead ribozyme motif along the tree of life. *RNA* 16, 1943-1950.
- Denti, MA, Martínez de Alba, AE, Sägesser, R, Tsagris, M, Tabler, M, (2000).** A novel RNA-binding protein from Triturus carnifex identified by RNA-ligand screening with the new hammerhead ribozyme. *Nucleic acids research* 28, 1045-1052.
- DeRose, VJ, (2002).** Two decades of RNA catalysis. *Chemistry and biology* 9, 961-969.
- Dingermann, T, Reindl, N, Werner, H, Hildebrandt, M, Nellen, W, Harwood, A, Williams, J, Nerke, K, (1989).** Optimization and in situ detection of Escherichia coli beta-galactosidase gene expression in Dictyostelium discoideum. *Gene* 85, 353-362.
- Eddy, S, (2005).** RNABOB 2.1. <ftp://selab.janelia.org/pub/software/rnabob/>.
- Eichinger, L, Pachebat, J, Glockner, G, Rajandream, MA, Sugang, R, Berriman, M, Song, J, Olsen, R, Szafranski, K, Xu, Q, Tunggal, B, Kummerfeld, S, Madera, M, Konfortov, BA, Rivero, F, Bankier, AT, Lehmann, R, Hamlin, N, Davies, R, Gaudet, P, Fey, P, Pilcher, K, Chen, G, Saunders, D, Sodergren, E, Davis, P, Kerhornou, A, Nie, X, Hall, N, Anjard, C, Hemphill, L, Bason, N, Farbrother, P, Desany, B, Just, E, Morio, T, Rost, R, Churcher, C, Cooper, J, Haydock, S, van Driessche, N, Cronin, A, Goodhead, I, Muzny, D, Mourier, T, Pain, A, Lu, M, Harper, D, Lindsay, R, Hauser, H, James, K, Quiles, M, Madan Babu, M, Saito, T, Buchrieser, C, Wardroper, A, Felder, M, Thangavelu, M, Johnson, D, Knights, A, Loulseged, H, Mungall, K, Oliver, K, Price, C, Quail, MA, Urushihara, H, Hernandez, J, Rabbinoiwitsch, E, Steffen, D, Sanders, M, Ma, J, Kohara, Y, Sharp, S, Simmonds, M, Spiegler, S, Tivey, A, Sugano, S, White, B, Walker, D, Woodward, J, Winckler, T, Tanaka, Y, Shaulsky, G, Schleicher, M,**

- Weinstock, G, Rosenthal, A, Cox, EC, Chisholm, RL, Gibbs, R, Loomis, WF, Platzer, M, Kay, RR, Williams, J, Dear, PH, Noegel, AA, Barrell, B, Kuspa, A, (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 435, 43-57.
- Eikmeier, J, (2011). Ribozymmotive in *Xenopus leavis*. Bachelorarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie, Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt.
- Ellington, AD und Szostak, JW, (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-822.
- Erdmann, VA, Barciszewska, MZ, Szymanski, M, Hochberg, A, de Groot, N, Barciszewski, J, (2001). The non-coding RNAs as riboregulators. *Nucleic acids research* 29, 189-193.
- Epstein, LM, Mahon, KA, Gall, JG, (1986). Transcription of a satellite DNA in the newt. *The journal of cell biology* 103, 1137-1144.
- Feldstein, PA, Buzayan, JM, Bruening G, (1989). Two sequences participating in the autolytic processing of satellite tobacco ringspot virus complementary RNA. *Gene* 82 (1), 53-61.
- Ferbeyre, G, Smith, JM, Cedergren, R, (1998). Schistosome satellite DNA encodes active hammerhead ribozymes. *Molecular and cell biology* 18, 3880-3888.
- Ferré-D'Amaré, AR, Zhou, K, Doudna, JA (1998). Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature* 395, 567-574.
- Flores, R, Daròs, JA, Hernández, C, (2000). Avsunviroidae family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Advances in virus research* 55, 271-323.
- Forster, AC und Symons, RH, (1987a). Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* 49, 211-220.
- Forster, AC und Symons, RH, (1987b). Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell* 50, 9-16.
- Gerisch, G und Malchow, D, (1976). Cyclic AMP receptors and the control of cell aggregation in *Dictyostelium*. *Advances in cyclic nucleotide research* 7, 49-68.
- Gilbert, W, (1986). Origin of life: The RNA world. *Nature* 319, 618.
- Green, MR und Sambrook, J, (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4. Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* Chapter 6, Protokoll 11, 394-400.
- Grewal, SI, Rice, JC, (2004). Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs. *Current opinion in cell biology* 16(3), 230-238.
- Guerrier-Takada, C, Gardiner, K, Marsh, T, Pace, N, Altman, S, (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35, 849-857.

- Hall, I, Noma, K, Grewal, SI, (2003).** RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 193-198.
- Hammann, C, Norman, DG, Lilley, DM, (2001).** Dissection of the ion-induced folding of the hammerhead ribozyme using ¹⁹F NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 5503-5508.
- Hammesfahr, B, Odronitz, F, Hellkamp, M, Kollmar, M, (2011).** diArk 2.0 provides detailed analyses of the ever increasing eukaryotic genome sequencing data. *BMC research notes* 4, 338.
- Hampel, A und Tritz, R, (1989).** RNA catalytic properties of the minimum (-)sTRSV sequence. *Biochemistry* 28(12), 4929-4933.
- Hanahan, D, (1983).** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology* 166, 557-580.
- He, L und Hannon, GJ, (2004).** MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews genetics* 5, 522-531.
- Hoogsteen, K, (1963).** The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallographica* 16, 907-916.
- Hubbard, TJP, Aken, BL, Ayling, S, Ballester, B, Beal, K, Bragin, E, Brent, S, Chen, Y, Clapham, P, Clarke, L, Coates, G, Fairley, S, Fitzgerald, S, Fernandez-Banet, J, Gordon, L, Graf, S, Haider, S, Hammond, M, Holland, R, Howe, K, Jenkinson, A, Johnson, N, Kahari, A, Keefe, D, Keenan, S, Kinsella, R, Kokocinski, F, Kulesha, E, Lawson, D, Longden, I, Megy, K, Meidl, P, Overduin, B, Parker, A, Pritchard, B, Rios, D, Schuster, M, Slater, G, Smedley, D, Spooner, W, Spudich, G, Trevanion, S, Vilella, A, Vogel, J, White, S, Wilder, S, Zadissa, A, Birney, E, Cunningham, F, Curwen, V, Durbin, R, Fernandez-Suarez, XM, Herrero, J, Kasprzyk, A, Proctor, G, Smith, J, Searle, S, Flicek, P, (2009).** Ensembl 2009. *Nucleic acids research* 37, D690–D697
- Maeda, Y, (2005).** Regulation of Growth and Differentiation in Dictyostelium. *International review of cytology* 244, 287-332.
- Jimenez, RM, Delwart, E, Lupták, A, 2011.** Structure-based search reveals hammerhead ribozymes in the human microbiome. *Journal of biological chemistry* 286, 7737-7743.
- Johnston, RF, Pickett, SC, Barker, DL, (1990).** Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis* 11, 355-360.
- Kalweit, A, Przybilski, R, Seehafer, C, de la Peña, M, Hammann, C, (2012).** Characterization of hammerhead ribozyme reactions. *Methods in molecular biology* 848, 5-20.

- Khvorova, A, Lescoute, A, Westhof, E, Jayasena, SD, (2003).** Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nature Structural Biology* 10, 708-712.
- Kim, YK und Kim, VN, (2007).** Processing of intronic microRNAs. *EMBO journal* 26, 775-783.
- Kruger, K, Grabowski, PJ, Zaug, AJ, Sands, J, Gottschling, DE, Cech, TR, (1982).** Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 31 (1), 147-157.
- Kruse, J, (2010).** Charakterisierung der DExH Box RNA Helikase Dhx9 in *Dictyostelium discoideum*. Diplomarbeit angefertigt am Institut für Genetik, Fachbereich 18 Naturwissenschaften der Universität Kassel.
- Lai, MM, (1995).** The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annual review of biochemistry* 64, 259-286.
- Lake, JA, (1967).** Yeast transfer RNA: a small-angle x-ray study. *Science* 156, 1371-1373.
- Lee, JF, Hesselberth, JR, Meyers, LA, Ellington, AD, (2004).** Aptamer database. *Nucleic acids research* 32, D95-D100.
- Legassie, JD und Jarstfer, MB, (2006).** The unmasking of telomerase. *Structure* 14, 1603-1609.
- Leontis, NB und Westhof, E, (2001).** Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *RNA* 7, 499–512.
- Leontis, NB, Stombaugh, J, Westhof, E, (2002).** The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucleic acids research* 30, 3497-3531.
- Levene, P, (1919).** The structure of yeast nucleic acid. *Journal of biological chemistry* 40 (2), 415-425.
- Lilley, DM, (2003).** The origins of RNA catalysis in ribozymes. *Trends in biochemical sciences* 28 (9), 495-501.
- Linskens, MH, Grootenhuis, PD, Blaauw, M, Huisman-de Winkel, B, Van Ravestein, A, Van Haastert, PJ, Heikoop, JC, (1999).** Random mutagenesis and screening of complex glycoproteins: expression of human gonadotropins in *Dictyostelium discoideum*. *FASEB journal* 13, 639-645.
- Luzi, E, Eckstein, F, Barsacchi, G, (1997).** The newt ribozyme is part of a riboprotein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 9711-9716.
- Macke, TJ, Ecker, DJ, Gutell, RR, Gautheret, D, Case, DA, Sampath, R, (2001).** RNAMotif, an RNA secondary structure definition and search algorithm. *Nucleic acids research* 29, 4724–4735.

- Malnasi-Csizmadia, A, Woolley, RJ, Bagshaw, CR, (2000).** Resolution of conformational states of Dictyostelium myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: implications for the open-closed transition identified by crystallography. *Biochemistry* 39, 16135-16146.
- Mandal, M, Boese, B, Winkler, WC, Breaker, RR, (2003).** Riboswitches Control Fundamental Biochemical Pathways in Bacillus subtilis and Other Bacteria. *Cell* 113, 577–586.
- Mandal, M und Breaker, RR, (2004).** Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nature structural and molecular biology* 11 (1), 29-35.
- Martick, M, Horan, LH, Noller, HF, Scott, WG, (2008).** A discontinuous hammerhead ribozyme embedded in a mammalian messenger RNA. *Nature* 454, 899-902.
- Martick, M und Scott, WG, (2006).** Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell* 126, 309-320.
- Masquida, B und Westhof, E, (2000).** On the wobble G-U and related pairs. *RNA* 6, 9-15.
- Meister, G, Landthaler, M, Patkaniowska, A, Dorsett, Y, Teng, G, Tuschl, T, (2004).** Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell* 15 (2), 185-197.
- Mello, CC und Conte, DJ, (2004).** Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431, 338-42.
- Miller, SL, (1953).** A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science* 117, 528-529.
- Miller, SL und Urey, HC, (1959).** Origin of Life. *Science* 130, 1622-1624.
- Mullis, K, Faloona, F, Scharf, S, Saiki, R, Horn, G, Erlich, H, (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 1, 263-273.
- Nelson, JA und Uhlenbeck, OC, (2008).** Hammerhead redux: does the new structure fit the old biochemical data? *RNA* 14, 605-615.
- Nissen, P, Hansen, J, Ban, N, Moore, PB, Steitz, TA, (2000).** The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920-930.
- Obermayer, B, Krammer, H, Braun, D, Gerland, U, (2011).** Emergence of information transmission in a prebiotic RNA reactor. *Physical review letters* 107, 018101-(1-4).
- O'Brien, R, Ladbury, JE, Chowdhry, BZ, (2001).** Isothermal titration calorimetry of biomolecules. In "Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry"; Practical Approach Series; Harding, SE, Chowdhry, BZ, Eds.; *Oxford University Press New York*.

- Penedo, JC, Wilson, TJ, Jayasena, SD, Khvorova, A, Lilley, DM, (2004).** Folding of the natural hammerhead ribozyme is enhanced by interaction of auxiliary elements. *RNA* 10, 880-888.
- Perreault, J, Weinberg, Z, Roth, A, Popescu, O, Chartrand, P, Ferbeyre, G, Breaker, RR, (2011).** Identification of hammerhead ribozymes in all domains of life reveals novel structural variations. *PLoS computational biology* 7, e1002031.
- Powner, MW, Gerland, B, Sutherland, JD, (2009).** Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions. *Nature* 459, 239-242.
- Prodromou, C und Pearl, LH, (1992).** Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein engineering* 5, 827-829.
- Prody, GA, Bakos, JT, Buzayan, JM, Schneider, IR, Bruening, G, (1986).** Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* 231, 1577-1580.
- Przybilski, R, Gräf, S, Lescoute, A, Nellen, W, Westhof, E, Steger, G, Hammann, C, (2005).** Functional Hammerhead Ribozymes Naturally Encoded in the Genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17, 1877-1885.
- Przybilski, R und Hammann, C, (2006).** The hammerhead ribozyme structure brought in line. *Chembiochem* 7, 1641-1644.
- Przybilski, R und Hammann, C, (2007).** The tolerance to exchanges of the Watson Crick base pair in the hammerhead ribozyme core is determined by surrounding elements. *RNA* 13, 1625-1630.
- Raper, KD, (1935).** *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leafs. *Journal of agricultural research* 50, 135-147.
- Rietveld K, Van Poelgeest R, Pleij CW, Van Boom JH, Bosch L, (1982).** The tRNA-like structure at the 3' terminus of turnip yellow mosaic virus RNA. Differences and similarities with canonical tRNA. *Nucleic acids research* 10, 1929-1946.
- Reeder, J und Giegerich, R, (2009).** RNA secondary structure analysis using the RNAsnp package. *Current protocols in bioinformatics* Kapitel 12, 12-18.
- Rogers, SO und Bendich, AJ, (1988).** Extraction of DNA from plant tissues. *Plant molecular biology Manual* A6, 1-10.
- Rojas, AA, Vazquez-Tello, A, Ferbeyre, G, Venanzetti, F, Bachmann, L, Paquin, B, Sbordonni, V, Cedergren, R, (2000).** Hammerhead-mediated processing of satellite pDo500 family transcripts from Dolichopoda cave crickets. *Nucleic acids research* 28, 4037-4043.
- Rocheleau, L und Pelchat, M, (2006).** The Subviral RNA Database: A toolbox for viroids, the hepatitis deltavirus and satellite RNAs research. *BMC Microbiology* 6, 24.
- Ruffner, DE, Stormo, GD, Uhlenbeck, OC, (1990).** Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry* 29, 10695-10702.

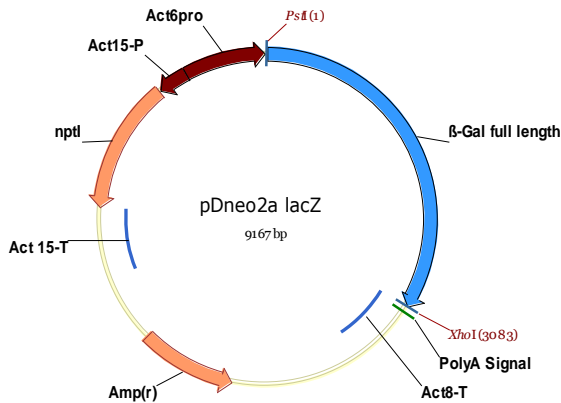
- Saiki, RK, Scharf, S, Faloona, F, Mullis, KB, Horn, GT, Erlich, HA, Arnheim, N, (1985).** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Salehi-Ashtiani, K und Szostak, JW, (2001).** In vitro evolution suggests multiple origins for the hammerhead ribozyme. *Nature* 414, 82–84.
- Sampson, JR, Sullivan, FX, Behlen, LS, DiRenzo, AB, Uhlenbeck, OC, (1987).** Characterization of two RNA-catalyzed RNA cleavage reactions. *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology* 52, 267-275.
- Saville, BJ und Collins, RA, (1990).** A site-specific self-cleavage reaction performed by a novel RNA in *Neurospora* mitochondria. *Cell* 61, 685-696.
- Seehafer, C, Kalweit, A, Steger, G, Gräf, S, and Hammann, C, (2011).** From alpaca to zebrafish: hammerhead ribozymes wherever you look. *RNA* 17, 21-26.
- Seehafer, C, (eingereicht 2012).** Identifizierung von RNA-Motiven durch Datenbankanalysen. Doktorarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie, Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt.
- Sleutels, F, Zwart, R, Barlow, DP, (2002).** The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* 415, 810-813.
- Stage-Zimmermann, TK und Uhlenbeck, OC, (1998).** Hammerhead ribozyme kinetics. *RNA* 4, 875–889.
- Staple, DW und Butcher, SE, (2005).** Pseudoknots: RNA structures with diverse functions. *PLoS Biology* 3, 956-959.
- Stix, F, (2011).** Analyse von Typ I Hammerhead Ribozymen aus *Xenopus tropicalis*. Bachelorarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie, Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt.
- Tabler, M und Tsagris, M, (2004).** Viroids: Petite RNA pathogens with distinguishedtalents. *Trends in plant science* 9, 339–348.
- Temin, HM und Mizutani, S, (1970).** RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213.
- Tucker, BJ und Breaker, RR, (2005).** Riboswitches as versatile gene control elements. *Current opinion in structural biology* 15, 342–348.
- Uhlenbeck, OC, (1987).** A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* 328, 596-600.
- Urushihara, H, (2008).** Developmental Biology of the social amoeba: History, current knowledge and prospects. *Development, Growth & Differentiation* 50, 277-281.
- Venter, JC, Adams, MD, Sutton, GG, Kerlavage, AR, Smith, HO, Hunkapiller, M, (1998).** Shotgun sequencing of the human genome. *Science* 280, 1540-1542.

- Voit, R, (2009).** Analyse von Promotorstärke und aktiver RNA-Synthese. In Friedrich Lottspeich und Joachim W. Engels (Hrsg.), *Bioanalytik* (2. Aufl. S. 909-910). Heidelberg: Spektrum Verlag.
- Völkel, S, (2011).** **Charakterisierung von Typ III Hammerhead Ribozymen in *Hydra magnipapillata*.** Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie, Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt.
- Wagner, EG und Simons, RW, (1994).** Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids. *Annual review of microbiology* 48, 713-742.
- Watson, JD und Crick, FH, (1953).** Molecular structure of nucleic acids; a structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.
- Weinberg, Z und Ruzzo, WL (2006)** Sequence-based heuristics for faster annotation of non-coding RNA families. *Bioinformatics* 22, 35–39.
- Weinberg, Z, Wang, JX, Bogue, J, Yang, J, Corbino, K, Moy, RH, Breaker, RR, (2010).** Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea and their metagenomes. *Genome biology* 11, 3.
- Wiegand, S, (2012).** Funktionelle Charakterisierung von RNA abhängigen RNA Polymerasen aus *Dictyostelium discoideum*. Doktorarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie, Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt.
- Wieland, M, Gfell, M, Hartig, JS, (2009).** Expanded hammerhead ribozymes containing addressable three-way junctions. *RNA* 15, 968-976.
- Winkler, W, Nahvi, A, Breaker, RR, (2002).** Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419, 952-956.
- Winkler, WC, Nahvi, A, Roth, A, Collins, JA, Breaker, RR, (2004).** Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* 428, 281-286.
- Win, MN und Smolke, CD, (2008).** Higher-order cellular information processing with synthetic RNA devices. *Science* 322, 456-460.
- Zuker, M, 2003.** Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* 31, 3406-3415.
- Yao, Z, Weinberg, Z, Ruzzo, WL, (2006).** CMfinder—a covariance model based RNA motif finding algorithm. *Bioinformatics* 22, 445–452.
- Zuker, M, (2003).** Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* 31, 3406-3415.
- Zuker, M und Stiegler, P, (1981).** Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic acids research* 9, 133-148.

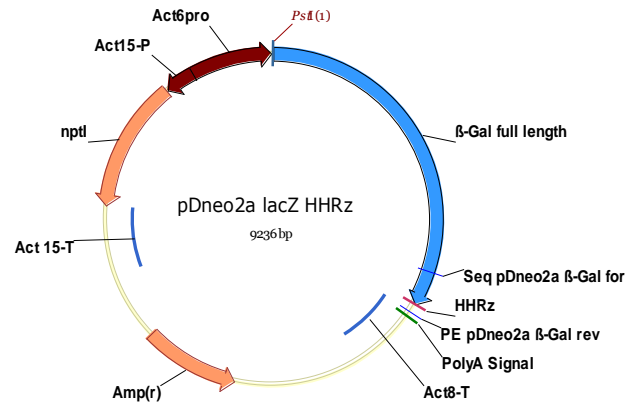
8. Anhang

A1 Vektorkarten

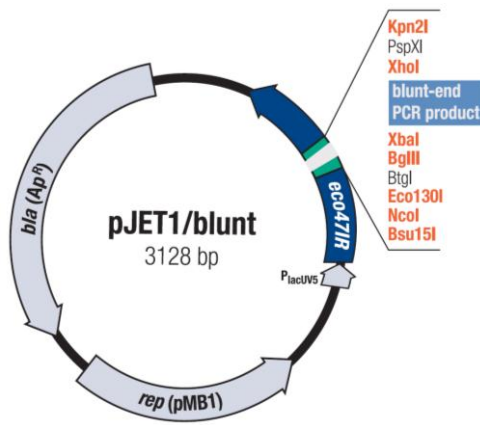
pDneo2a lacZ



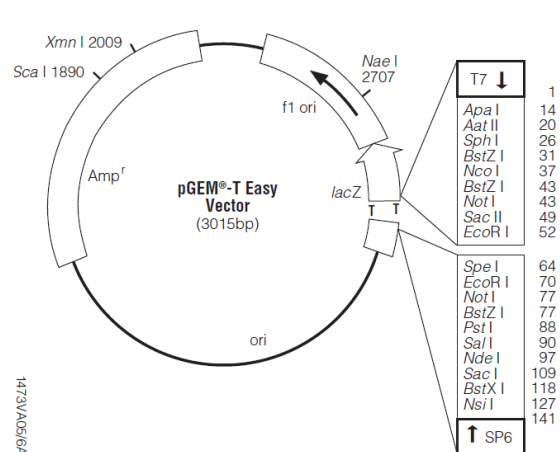
pDneo2a lacZ HHRz



pJET1/blunt



pGEM®-T Easy



A2 radioaktive Markierung der Größenstandards für PAA-Gelelektrophorese

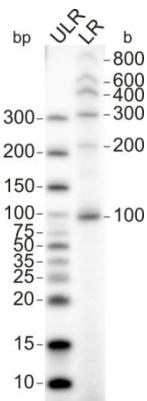


Abb. A2: radioaktive Markierung der Größenstandards

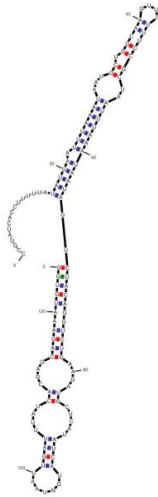
Die Markierung der Marker GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (ULR) und RiboRuler™ Low Range RNA Ladder (LR) erfolgte mittels T4 PNK und nach dem Protokoll der Firma Fermentas. Auftrennung der Marker in einem 20%igem denaturierenden PAA-Gel. Die Visualisierung erfolgte nach einer Expositionszeit von 30 min mittels eines PhosphorImagers.

A3 Sekundärstruktur der unter 5.1.1 analysierten HHRz Motive

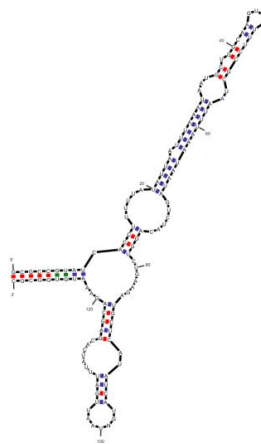
Vergleichend sind die Strukturen der freien Faltung (HHRz free), der freien Faltung mit Anhang des Basentriplets (HHRz free+GGG/GCG/GGC) und der gezwungenen Faltung (HHRz motiv) dargestellt.

Sekundärstrukturen der nicht spaltenden HHRz

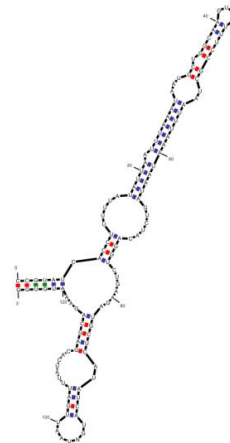
Xetr3 free



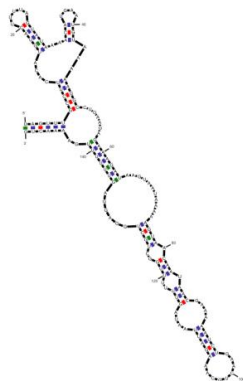
Xetr3 free + GGG



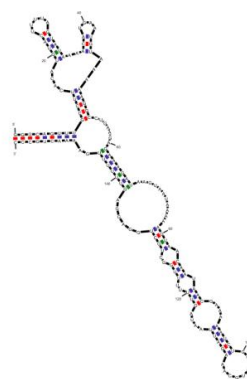
Xetr3 motiv



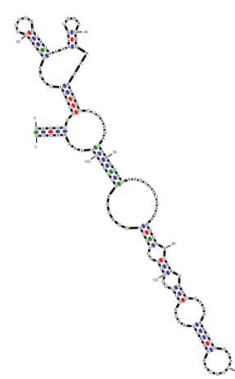
Xetr6 free



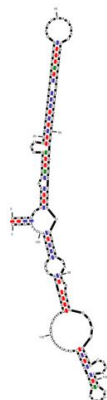
Xetr6 free + GGG



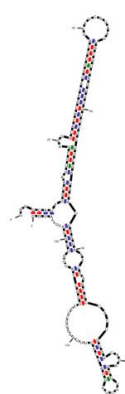
Xetr6 motiv



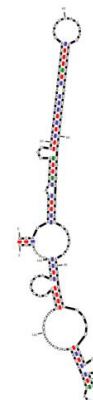
Xetr9 free



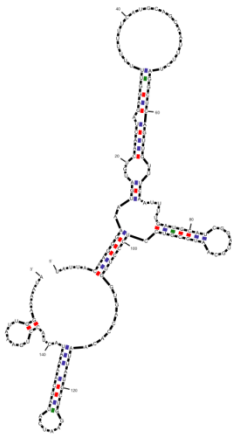
Xetr9 free + GGG



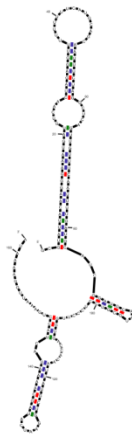
Xetr9 motiv



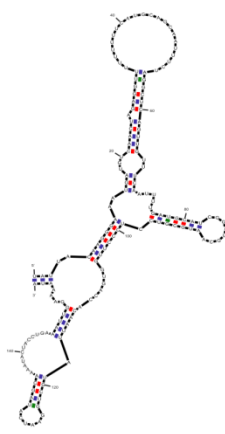
Xetr10 free



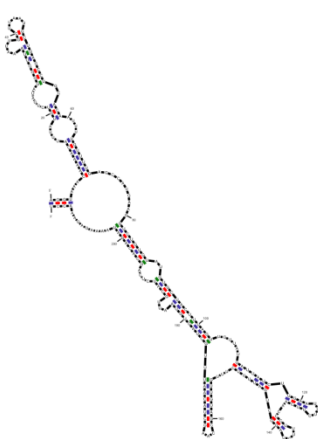
Xetr10 free +GCG



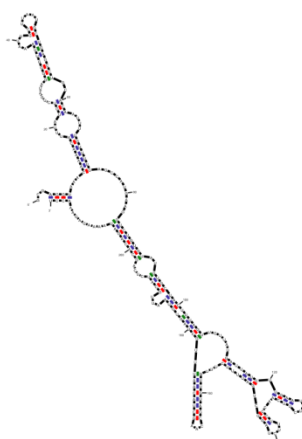
Xetr10 motiv



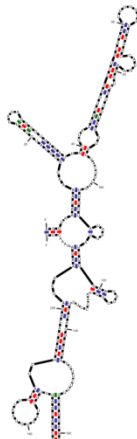
Xetr11 free



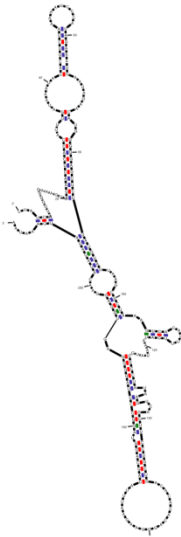
Xetr11 free + GCG



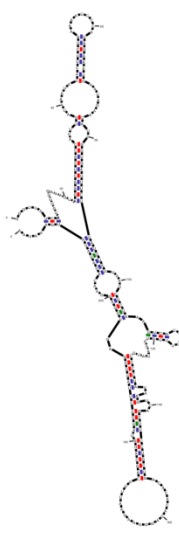
Xetr11 motiv



Xetr12 free



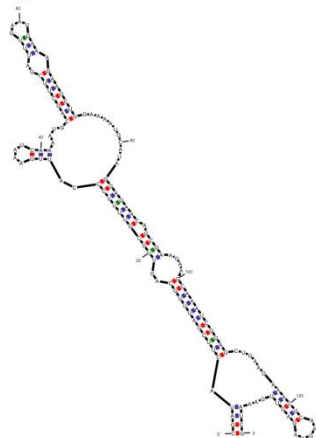
Xetr12 free + GGG



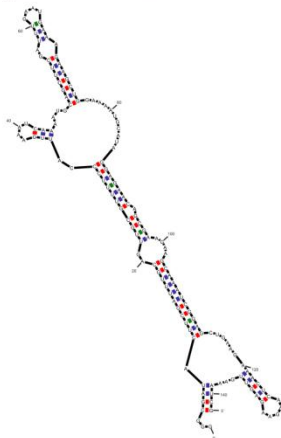
Xetr12 motiv



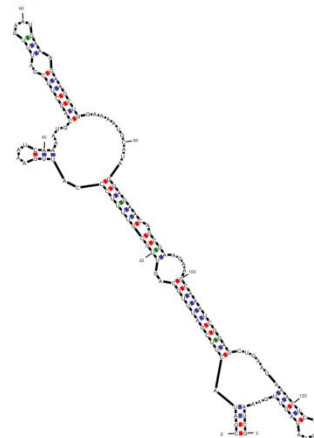
Arly2 free



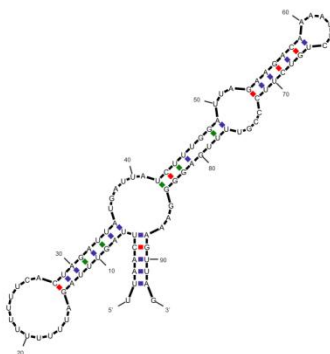
Arly2 free + GGG



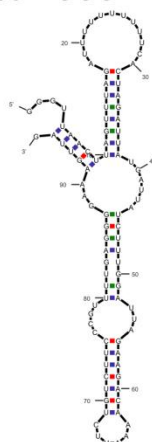
Arly2 motiv



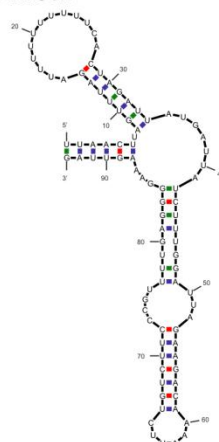
Arly4 free



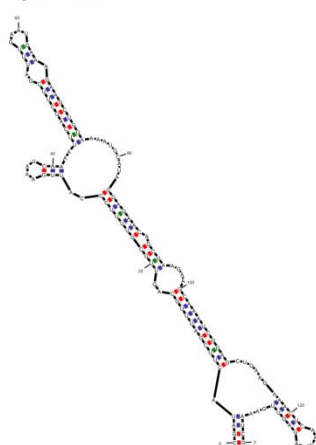
Arly4 free + GGG



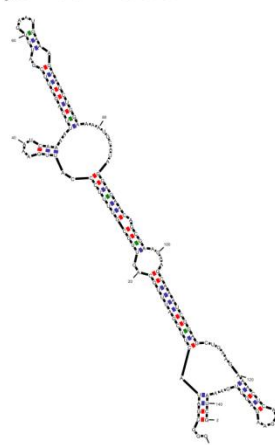
Arly4 motiv



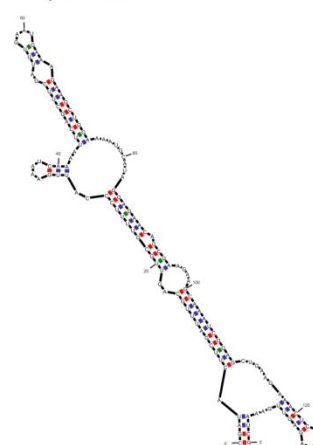
Arly5 free



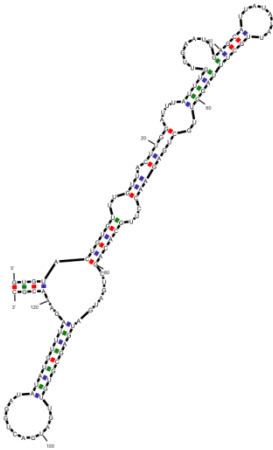
Arly5 free + GGG



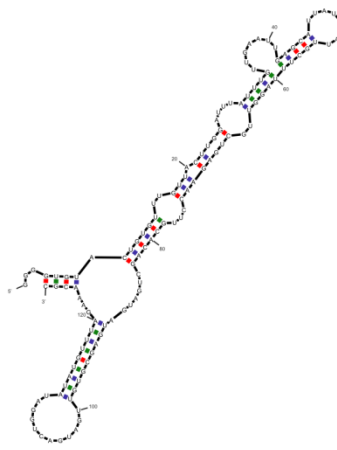
Arly5 motiv



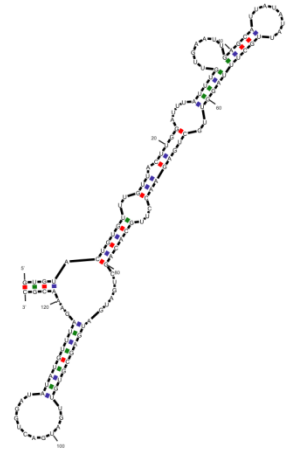
Arth1 free



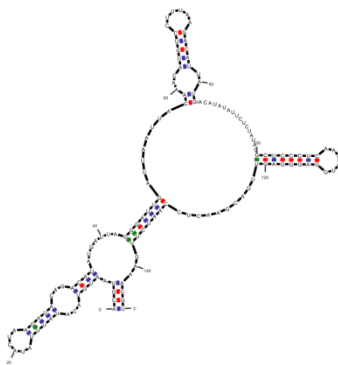
Arth1 free + GGG



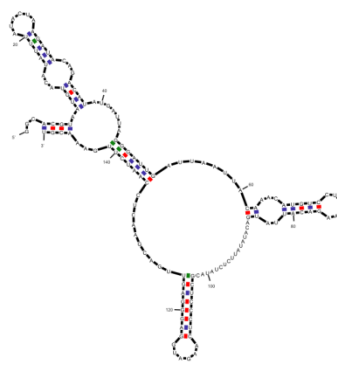
Arth1 motiv



Arth5 free



Arth5 free + GGC



Arth5 motiv

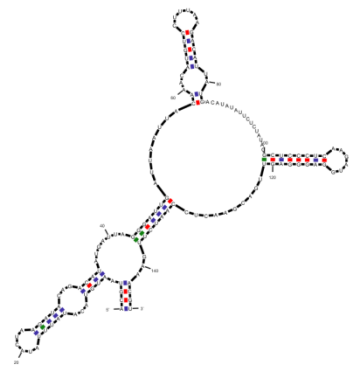
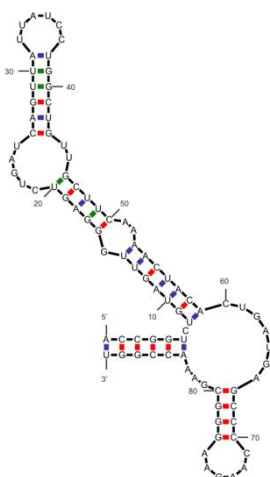


Abb. A3.1: Sekundärstrukturen der nicht spaltenden HHRz

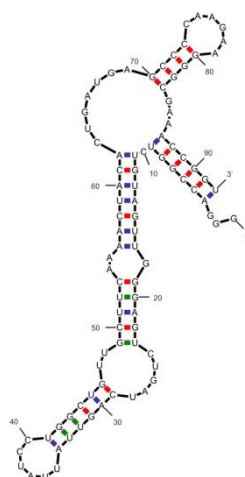
Sekundärstrukturen der resultierenden RNAs der 11 nicht spaltenden HHRz Motive, die mit Hilfe des Programms Mfold analysiert wurden. Dargestellt sind, jeweils von links nach rechts, die Sekundärstrukturen der freien Faltung (HHRz free), der freien Faltung nach Anhang eines Basentriplets (HHRz free+GGG/GCG/GGC) und die der erzwungenen Faltung (HHRz motiv).

Sekundärstrukturen der spaltenden HHRz

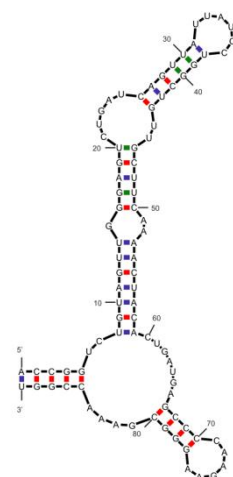
Xetr1 free



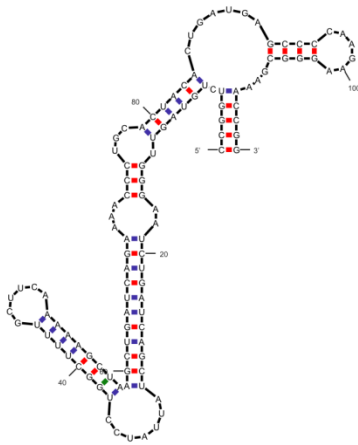
Xetr1 free + GGG



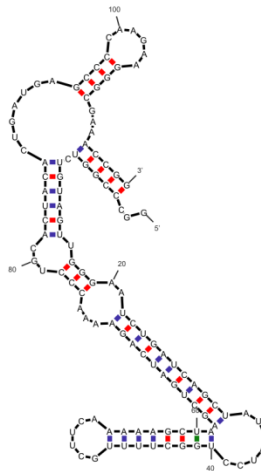
Xetr1 motiv



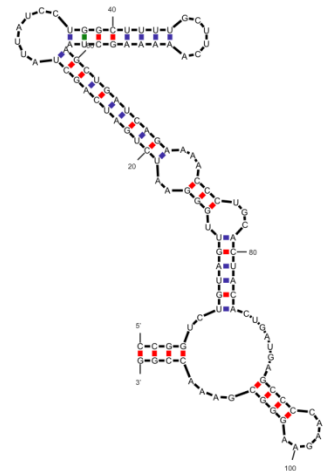
Xetr2 free



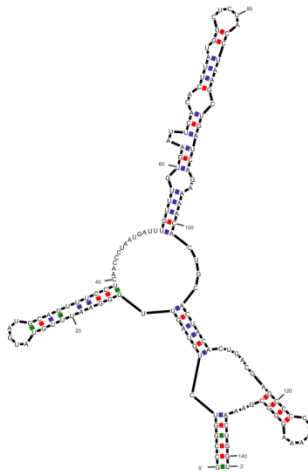
Xetr2 free + GGC



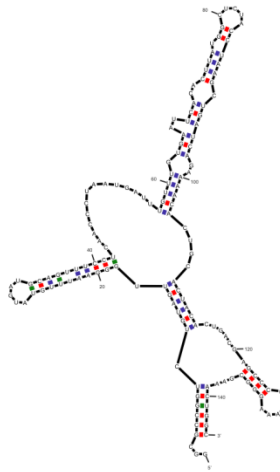
Xetr2 motiv



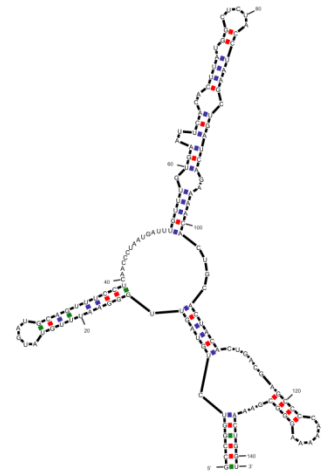
Xetr4 free



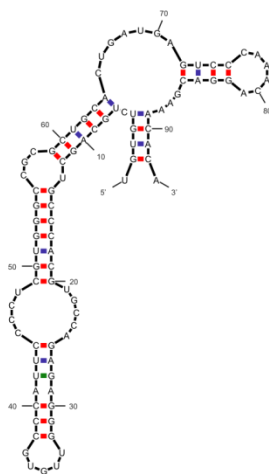
Xetr4 free + GGC



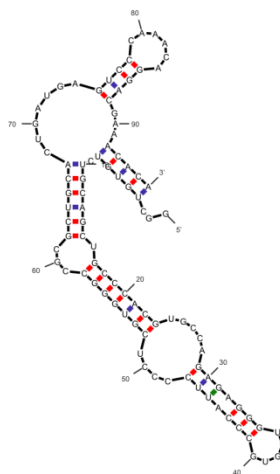
Xetr4 motiv



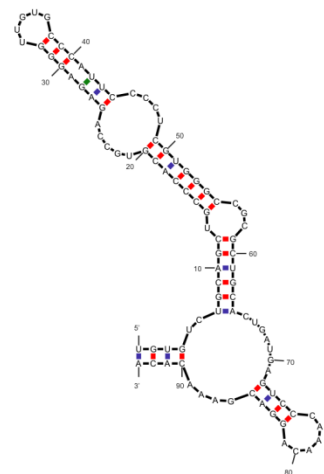
Xetr5 free



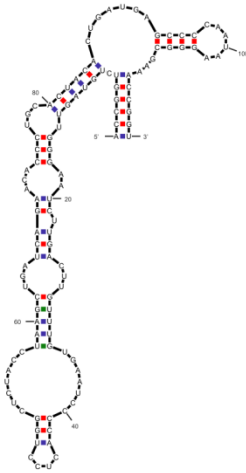
Xetr5 free + GGC



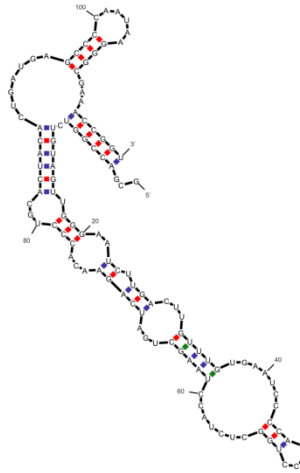
Xetr5 motiv



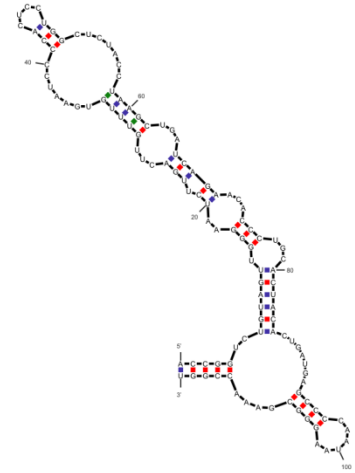
Xetr7 free



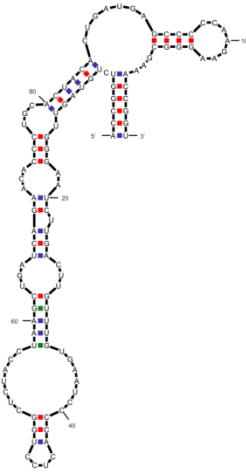
Xetr7 free + GCG



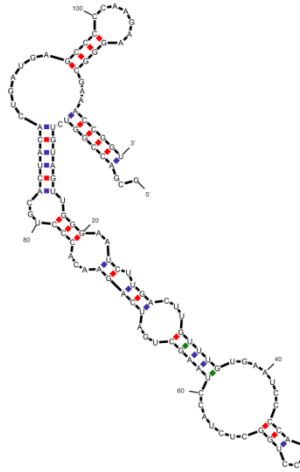
Xetr7 motiv



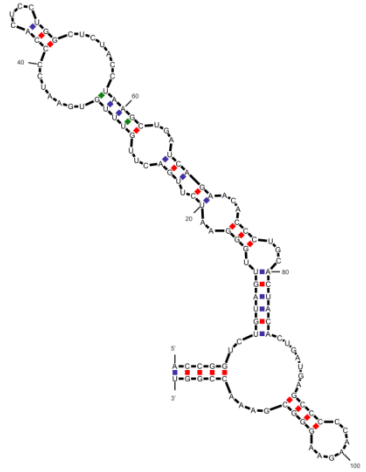
Xetr8 free



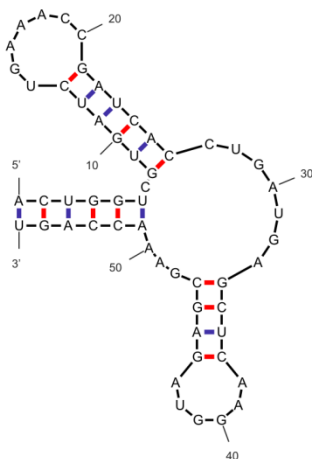
Xetr8 free + GCG



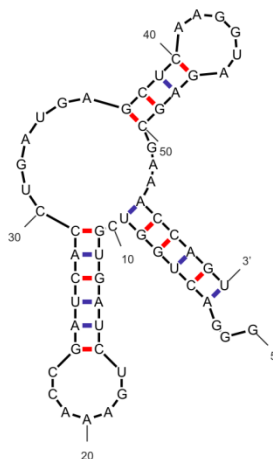
Xetr8 motiv



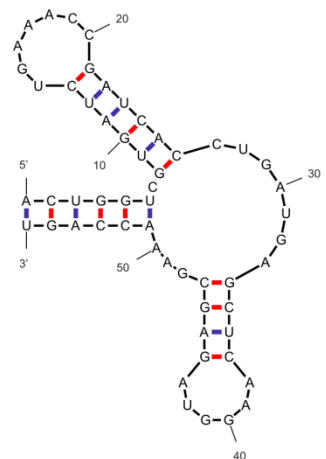
Arly3 free



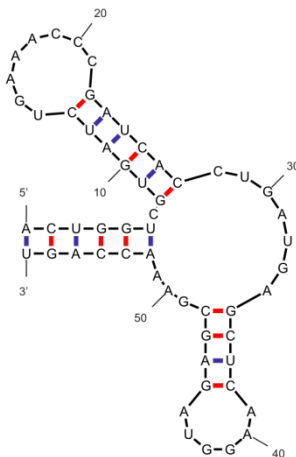
Arly3 free + GGG



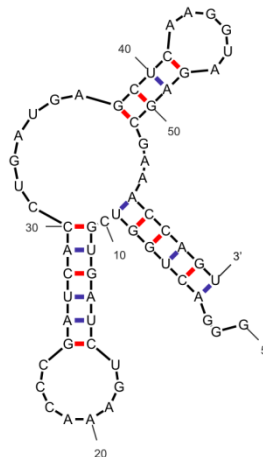
Arly3 motiv



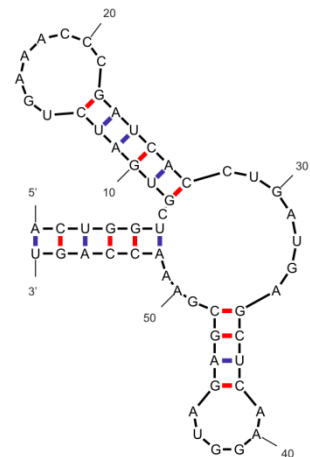
Ara1 free



Ara1 free + GGG



Ara1 motiv

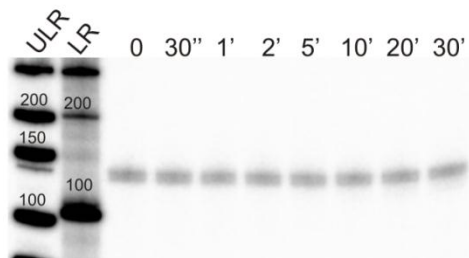
**Abb. A3.2: Sekundärstrukturen der spaltenden HHRz**

Sekundärstrukturen der resultierenden RNAs der acht spaltenden HHRz Motive, die mit Hilfe des Programms Mfold analysiert wurden. Dargestellt sind, jeweils von links nach rechts, die Sekundärstrukturen der freien Faltung (HHRz free), der freien Faltung nach Anhang eines Basentriplets (HHRz free+GGG/GCG/GGC) und die der erzwungenen Faltung (HHRz motiv).

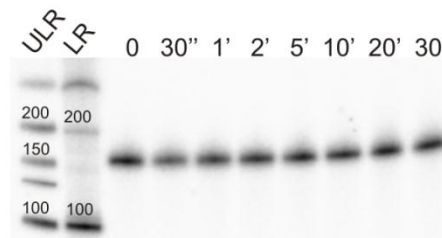
A4 *in vitro* Spaltungsexperimente

HHRz Motive ohne katalytische Aktivität bei 2 mM MgCl₂

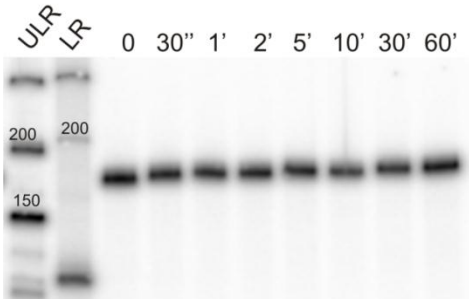
Xetr3



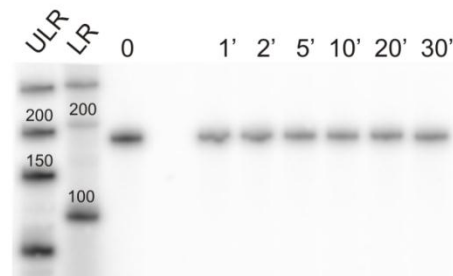
Xetr6



Xetr9



Xetr10



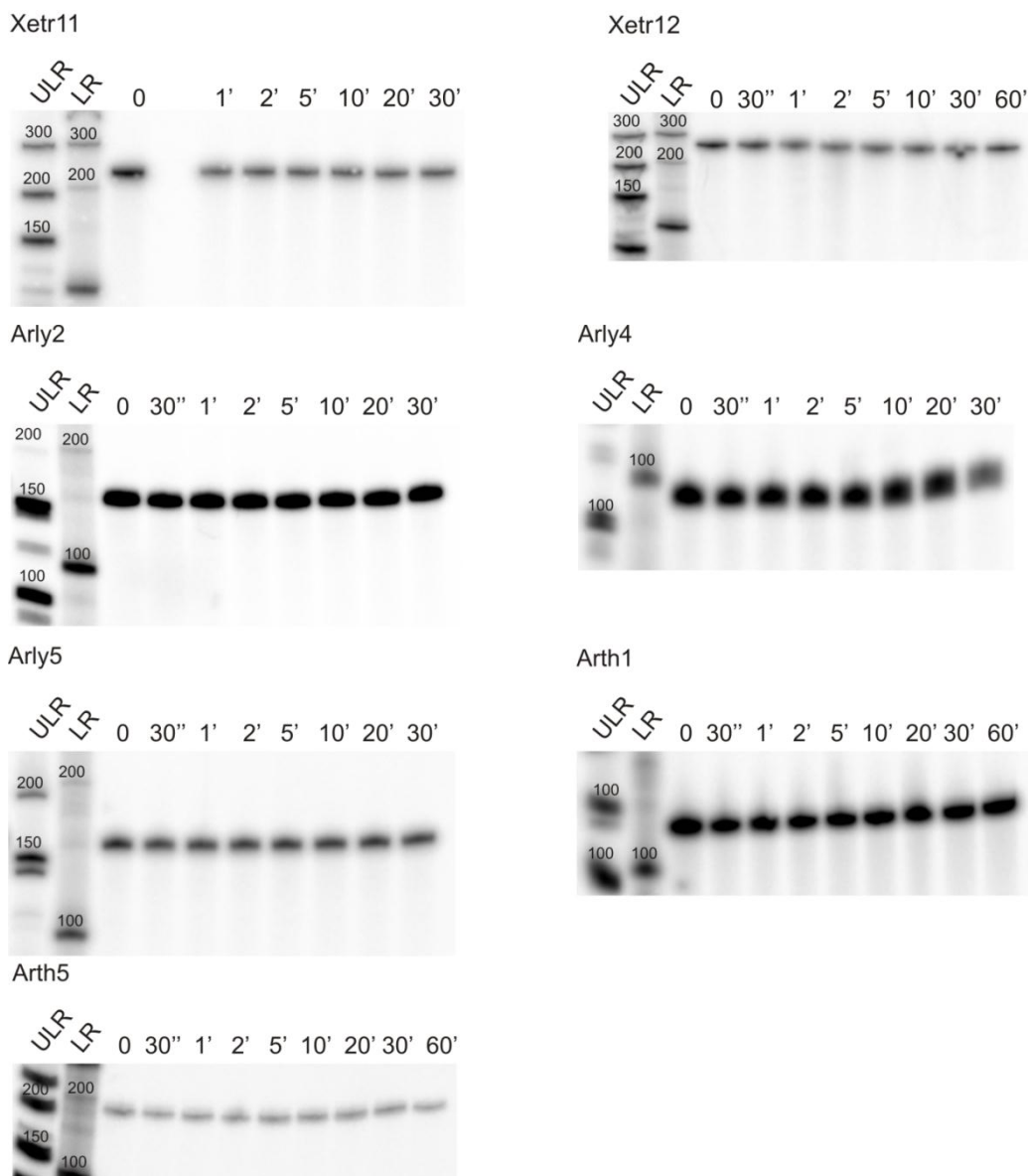
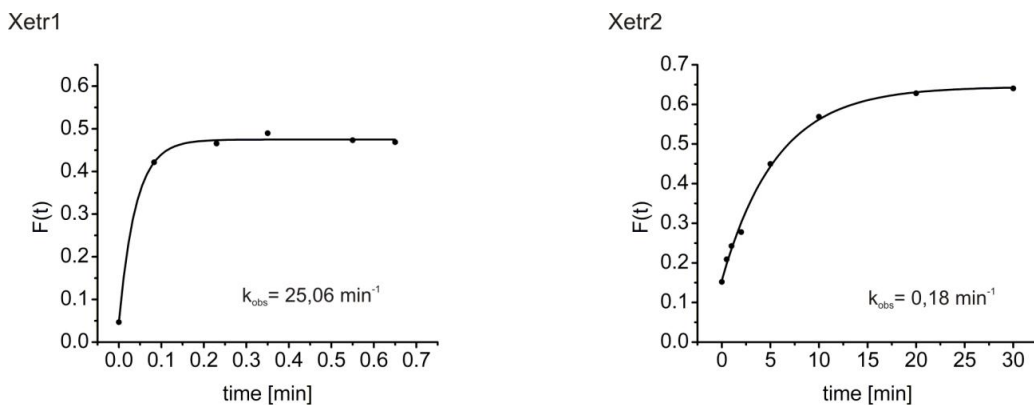


Abb. A4.1: Spaltungsanalysen der nicht spaltenden HHRz Motive

PAA-Gelanalyse der Spaltungsreaktion der nicht aktiven WT-Sequenzen bei 2 mM MgCl_2 in Abhängigkeit von der Zeit. Die Visualisierung erfolgte nach einer Exposition von 18-24h mittels eines PhosphorImagers. Als Größenstandard dienten die radioaktiv markierten Marker: GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (ULR) und RiboRuler™ Low Range RNA Ladder (LR).

HHRz Motive mit katalytischer Aktivität bei 2 mM MgCl_2



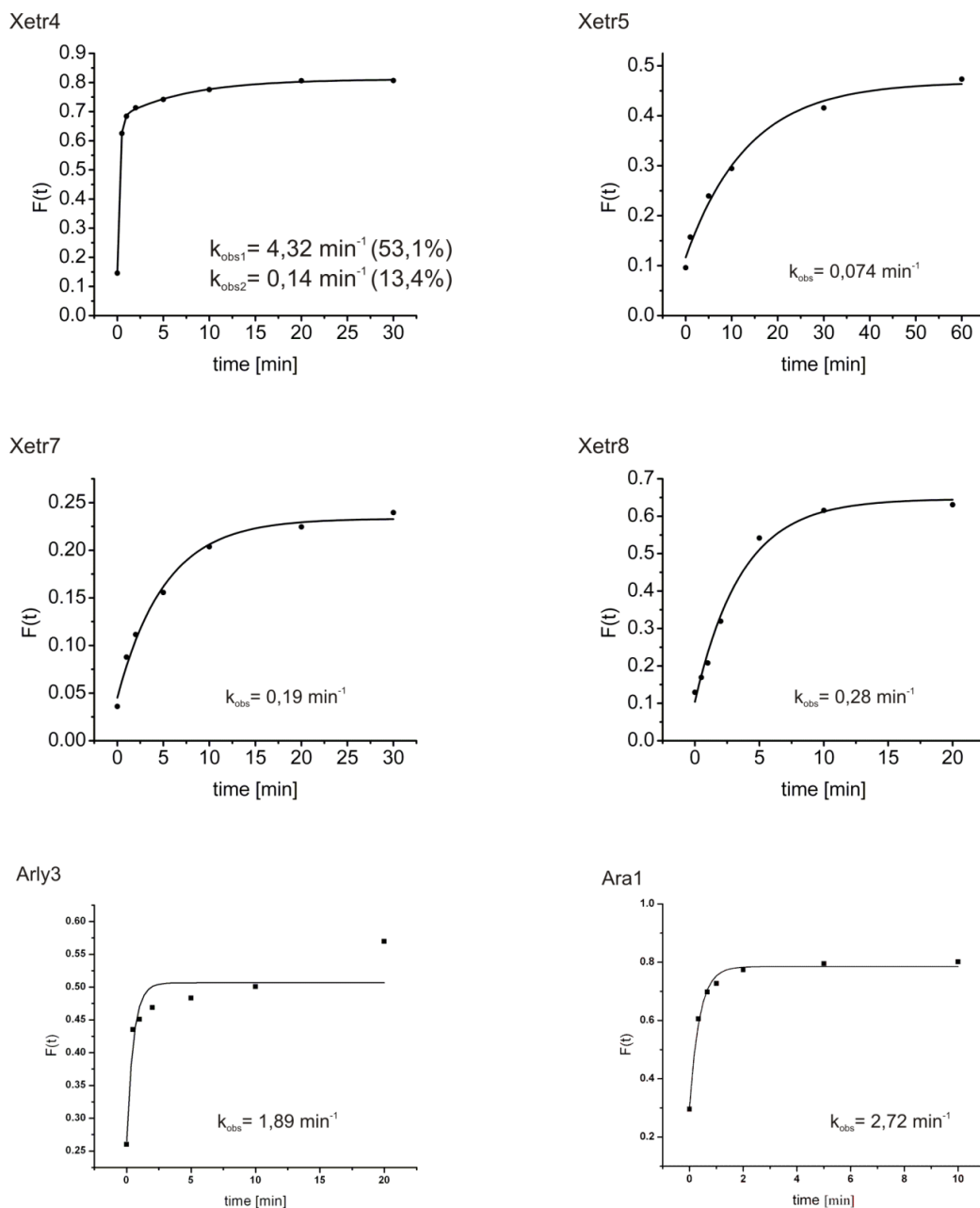
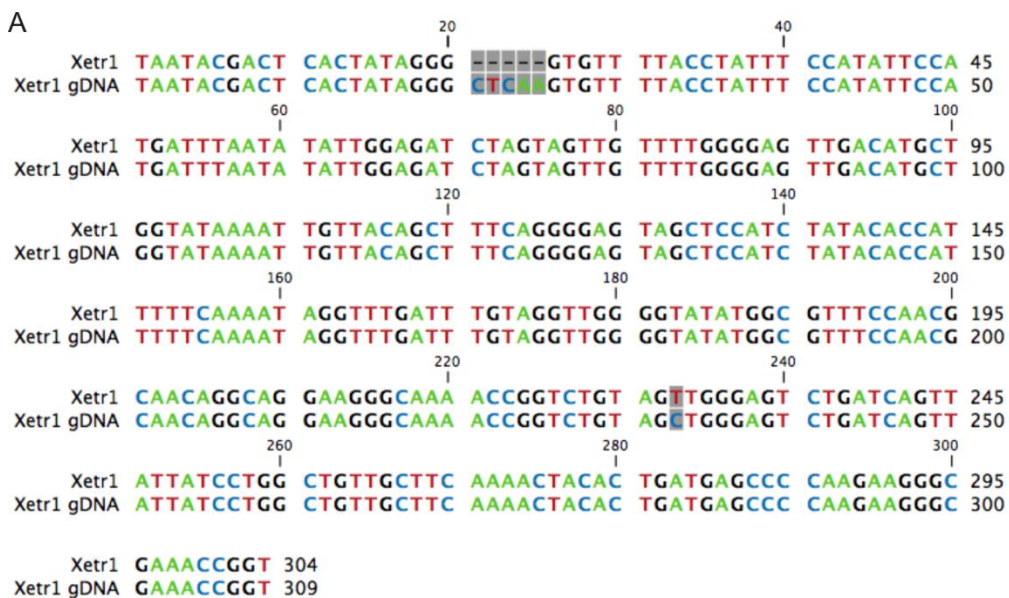


Abb. A4.2: Spaltungsanalysen der spaltenden HHRz Motive

Auswertung der Spaltungskinetik der katalytisch aktiven HHRz Motive. Die gespaltene Fraktion $F(t)$ wird für jeden Zeitpunkt aus der Intensität der beiden Spaltprodukte durch die Intensität der Spaltprodukte und der *full length* Transkripte errechnet, gegen die Zeit aufgetragen und durch Regression die kinetischen Parameter nach der Gleichung $F(t) = F_0 + F_{\infty}(1 - e^{-kt})$ bestimmt. F_0 ist die gespaltene Fraktion am Zeitpunkt 0 und F_{∞} am Endpunkt der Reaktion, k ist die Spaltkonstante (k_{obs}) in min^{-1} (Stage-Zimmermann und Uhlenbeck, 1998). Der k_{obs} -Wert ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Reaktion.

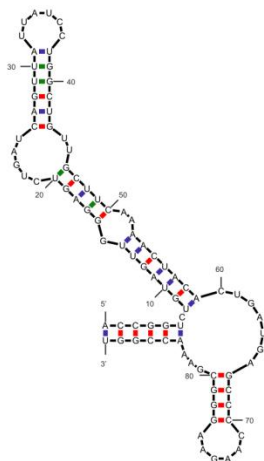
A5 Sequenzierung der *X. tropicalis* HHRz in ihrer genomischen Umgebung

HHRz umgebende Sequenz von Xetr1



B

Xetr1 HHRz



Xetr1 HHRz gDNA

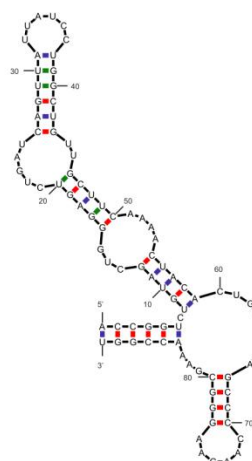
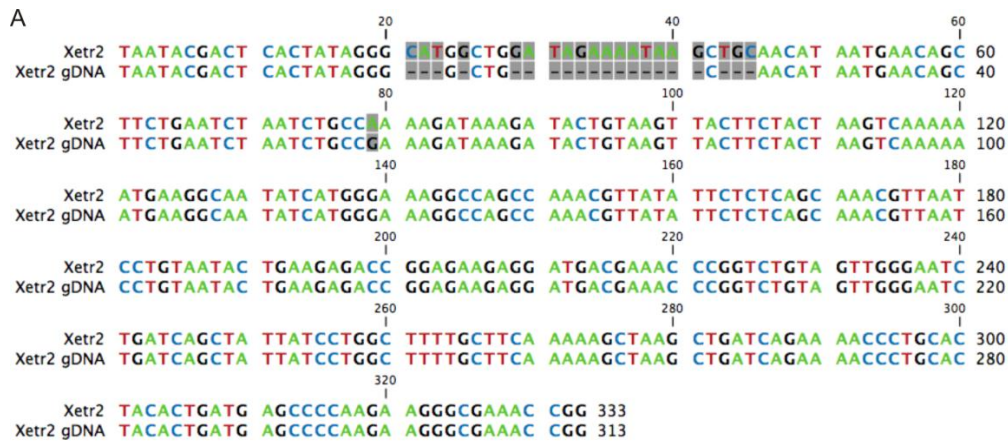


Abb. A5.1: Sequenzierung der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr1

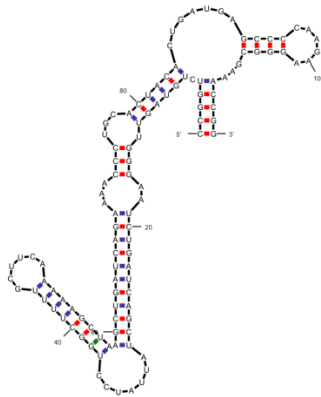
A zeigt die Sequenzen des auf genomischer Ebene (+ ca. 200 bp *upstream* des eigentlichen HHRz) amplifizierten Fragments im Vergleich zu der in der Datenbank annotierten Sequenz. Sequenzunterschiede sind grau unterlegt. **B** zeigt die daraus resultierende Sekundärstruktur für Xetr1 im Vergleich zu den Sequenzen aus der Datenbank.

HHRz umgebende Sequenz von Xetr2



B

Xetr2 HHRz



Xetr2 HHRz gDNA

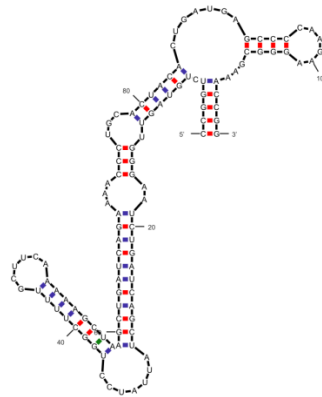
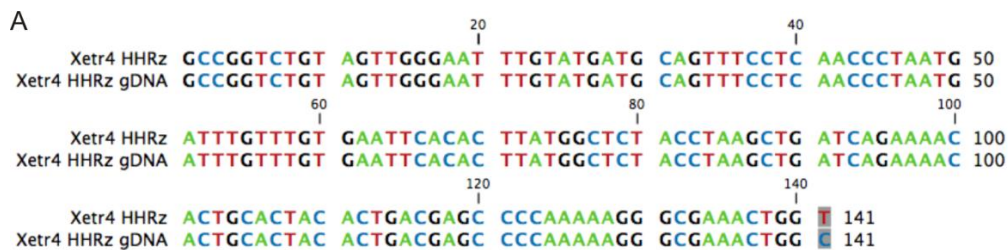


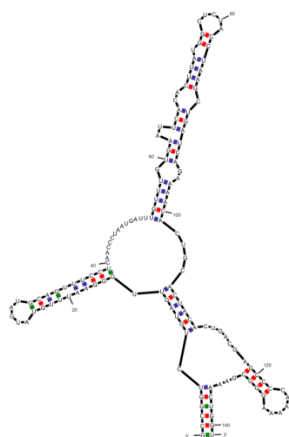
Abb. A5.2: Sequenzierung der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr2

A zeigt die Sequenzen des auf genomischer Ebene (+ ca. 200 bp *upstream* des eigentlichen HHRz) amplifizierten Fragments im Vergleich zu der in der Datenbank annotierten Sequenz. Sequenzunterschiede sind grau unterlegt. **B** zeigt die daraus resultierende Sekundärstruktur für Xetr2 im Vergleich zu den Sequenzen aus der Datenbank.

HHRz umgebende Sequenz von Xetr4



Xetr4 HHRz



Xetr4 HHRz gDNA

**Abb. A5.3: Sequenzierung des HHRz Xetr4**

A zeigt die Sequenzen des auf genomischer Ebene amplifizierten Fragments im Vergleich zu der in der Datenbank annotierten Sequenz. Sequenzunterschiede sind grau unterlegt. **B** zeigt die daraus resultierende Sekundärstruktur für Xetr4 im Vergleich zu den Sequenzen aus der Datenbank.

HHRz umgebende Sequenz von Xetr5**A**

A

20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300

Xetr5
TAAATACGACT C CTATAGGG CTCTCATGTT TATTTCTCTC CCCACAGGTT CCTTCTAGTA 60
Xetr5 gDNA TAAATACGACT C CTATAGGG CTCTCATGTT TATTTCTCTC CCCACAGGTT CCTTCTAGTA 56

Xetr5
GGAGACTCCC CGTGC GTGT ACCTTAATA CGGCCATGTT GGCAAGCGCG CTTGTCA CG 119
Xetr5 gDNA GGAGACTCCC CGTGC GTGT ACCTTAATA CGGCCATGTT GGCAAGCGCG CTTGTCA CG 115

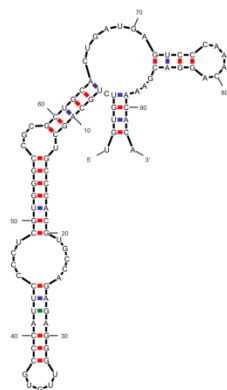
Xetr5
AGACAGGAAG TGGATCTGTA AAAAAATGGA CGCCATCAGT CACATGACAC ATTTTCTACTA 179
Xetr5 gDNA AGACAGGAAG TGGATCTGTA AAAAAATGGA CGCCATCAGT CACATGACAC ATTTTCTACTA 175

Xetr5
GGAGACACTA TGAGATGTTG CCCACATGTG TCTGCAGCTG CCCACGTGCC AGAGAGGGTT 239
Xetr5 gDNA GGAGACACTA TGAGATGTTG CCCACATGTG TCTGCAGCTG CCCACGTGCC AGAGAGGGTT 235

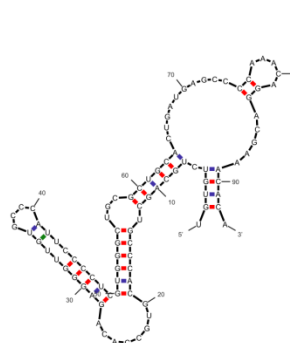
Xetr5
GTGCCCATTC CCCTCGTGGG GCGCTGCA CTGATGAGTC CCAACAGGA CGAAACACA 298
Xetr5 gDNA GTGCCCATTC CCCTCGTGGG GCGCTGCA CTGATGAGTC CCAACAGGA CGAAACACA 294

B

Xetr5 HHRz



Xetr5 HHRz gDNA

**Abb. A5.4: Sequenzierung der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr5**

A zeigt die Sequenzen des auf genomischer Ebene (+ ca. 200 bp *upstream* des eigentlichen HHRz) amplifizierten Fragments im Vergleich zu der in der Datenbank annotierten Sequenz. Sequenzunterschiede sind grau unterlegt. **B** zeigt die daraus resultierende Sekundärstruktur für Xetr5 im Vergleich zu den Sequenzen aus der Datenbank.

HHRz umgebende Sequenz von Xetr7

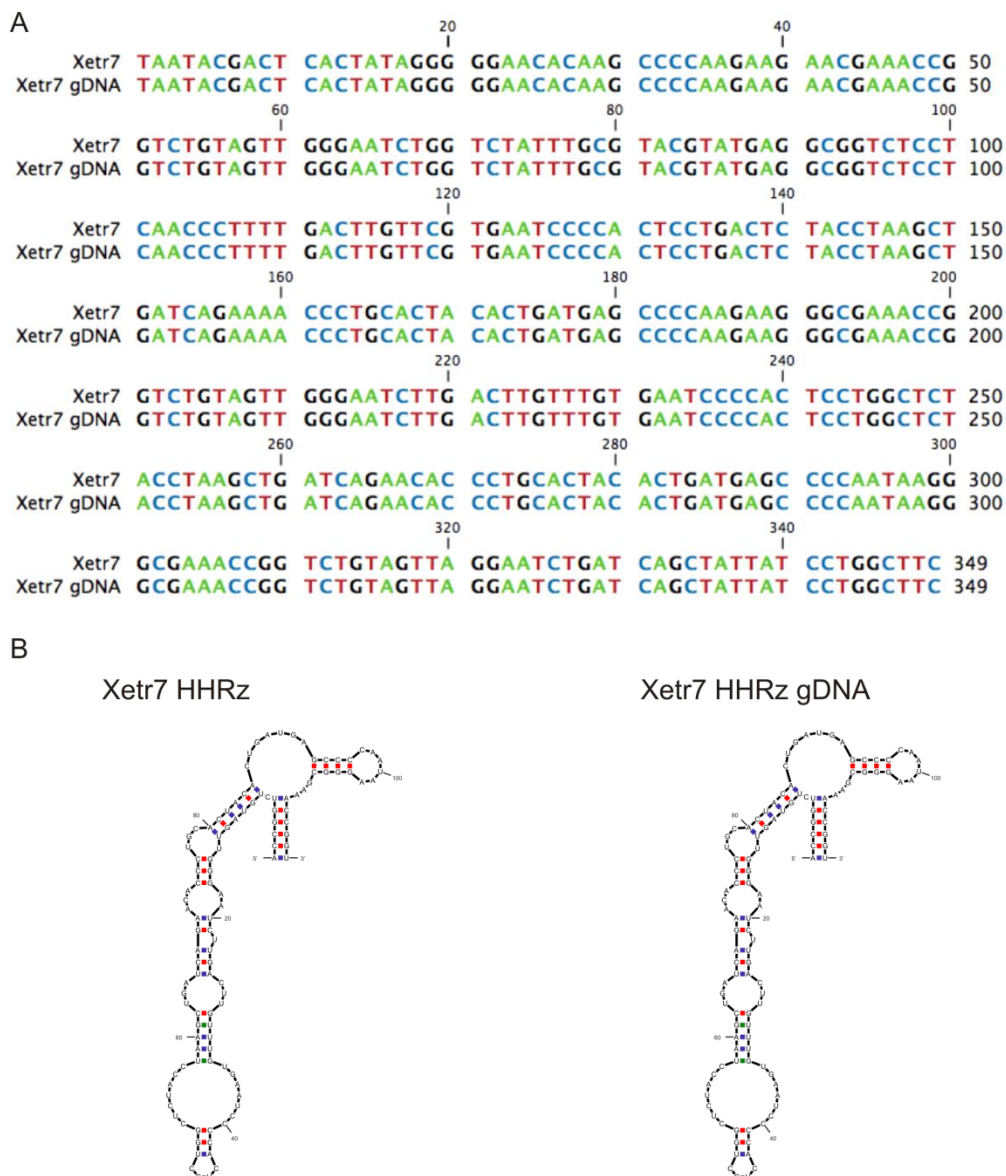


Abb. A5.5: Sequenzierung der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr7

A zeigt die Sequenzen des auf genomischer Ebene (+ ca. 200 bp *upstream* des eigentlichen HHRz) amplifizierten Fragments im Vergleich zu der in der Datenbank annotierten Sequenz. Sequenzunterschiede sind grau unterlegt. **B** zeigt die daraus resultierende Sekundärstruktur für Xetr7 im Vergleich zu den Sequenzen aus der Datenbank.

HHRz umgebende Sequenz von Xetr8

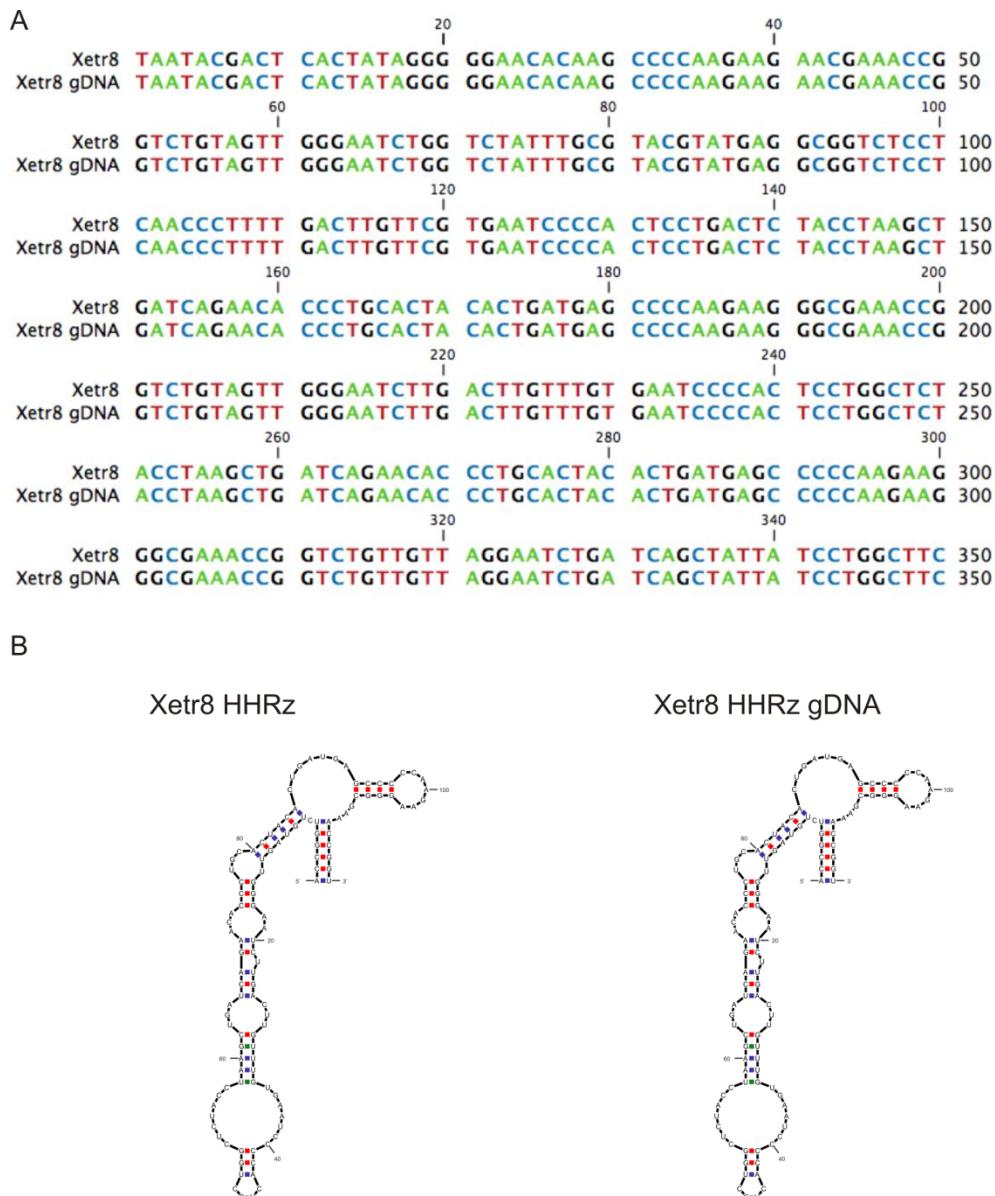


Abb. A5.6: Sequenzierung der HHRz umgebenden Sequenz von Xetr8

A zeigt die Sequenzen des auf genomischer Ebene (+ ca. 200 bp *upstream* des eigentlichen HHRz) amplifizierten Fragments im Vergleich zu der in der Datenbank annotierten Sequenz. Sequenzunterschiede sind grau unterlegt. **B** zeigt die daraus resultierende Sekundärstruktur für Xetr8 im Vergleich zu den Sequenzen aus der Datenbank.

A6 Sequenzen der antisense Sonden für S1 Nuklease Protektion Assay

HHRz umgebende Sequenz von Xetr7

Taatacgaactactatagggaaccgggttcgcccttattggggctcatcagtgtagtgcagggtgtctgatcagcttaggtagagccagg
 agtggggattcacaacaagtcaagattcccaactacagaccgggttcgcccttcttggggctcatcagtgtagtgcagggtttctgatc
 agcttaggtagagtcaggagtggggattcacgaacaagtcaaaagggttgaggagaccgcctcatcgtacgcaaatagaccagatt
 cccaactacagaccgggttcgtcttcttggggcttgtgtcc

HHRz umgebende Sequenz von Xetr8

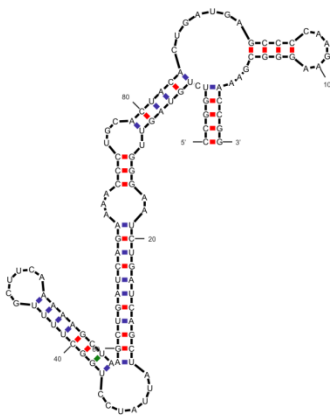
taatacgaactactatagggaccgggttcgcccttcttgggggctcatcagtgtagtgcagggtgttctgatcagcttaggttagagccag
gagtggggattcacaacaagtcaagattcccaactacagaccgggttcgcccttcttgggggctcatcagtgtagtgcagggtgttctga
tcagcttaggttagagtcaggagtgagggttcacgaacaagtaaaagggttgaggagaccgcctcatacgtacgcaaatagaccaga
ttcccaactacagaccgggttcgttcttcttggggcttgtgttcc

→ in grün ist die Sequenz des T7 Promotors hervorgehoben, der zusätzlich am 5'-Ende der Sonde angebracht wurde und zur radioaktiven Markierung mittels *in vitro* Transkription diente

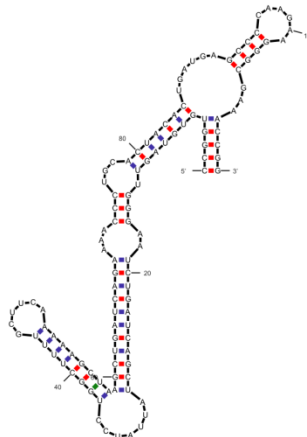
A7 Sekundärstrukturen der unter 5.4 analysierten Mutanten im Vergleich zum WT

Xetr2 Motive

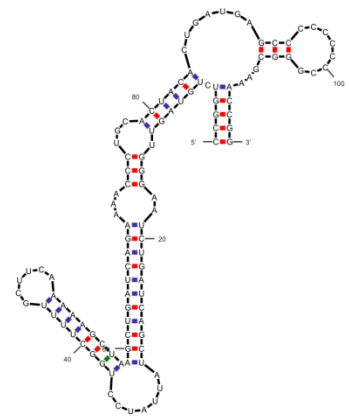
Xetr2 WT



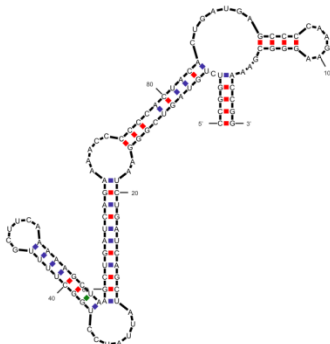
Xetr2 G17



Xetr2 L2pC



Xetr2 L1pC



Xetr2 L1L2pC

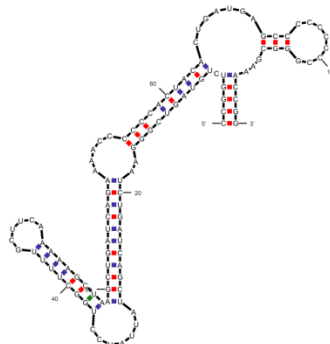
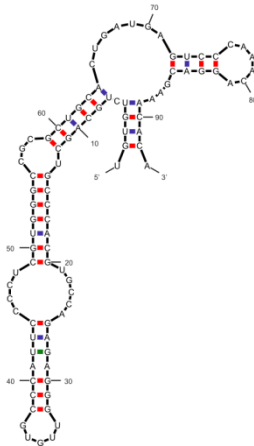


Abb. A7.1: Strukturen der generierten Mutanten basierend auf der Xetr2 WT Sequenz

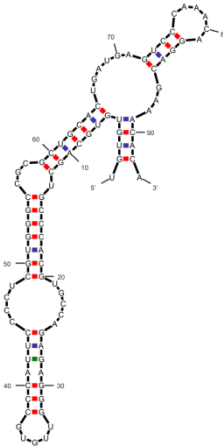
Xetr2 G17 Mutante mit einem G an Position 17 in der Core-Region anstatt einem C (oben Mitte). Xetr2 L1pC Mutante, gesamte Loop1 durch C ersetzt (unten links). Xetr2 L2pC Mutante, gesamte Loop2 durch C ersetzt (oben rechts). Xetr2 L1L2pC Mutante, Loop1 und 2 durch C ersetzt (unten Mitte).

Xetr5 Motive

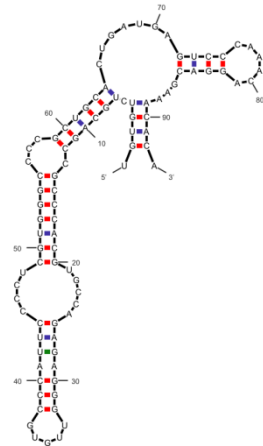
Xetr5 WT



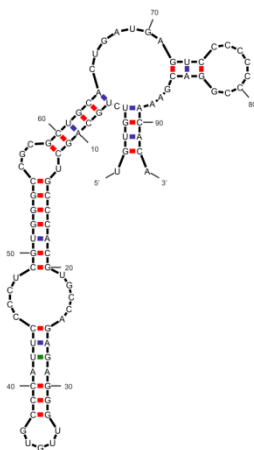
Xetr5 G17



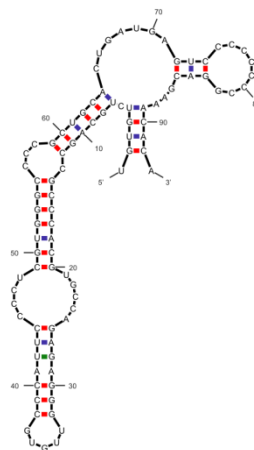
Xetr5 L1pC



Xetr5 L2pC



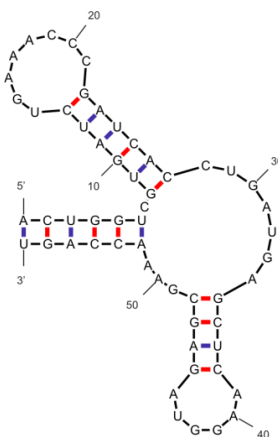
Xetr5 L1L2pC

**Abb. A7.2: Strukturen der generierten Mutanten basierend auf der Xetr5 WT Sequenz**

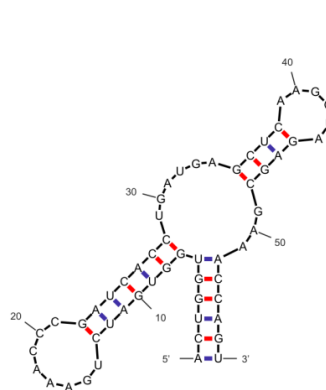
Xetr5 G17 Mutante mit einem G an Position 17 in der Core-Region anstatt einem C (oben Mitte). Xetr5 L1pC Mutante, gesamte Loop1 durch C ersetzt (oben rechts). Xetr5 L2pC Mutante, gesamte Loop2 durch C ersetzt (unten links). Xetr5 L1L2pC Mutante, Loop1 und 2 durch C ersetzt (unten Mitte).

Ara1 Motive

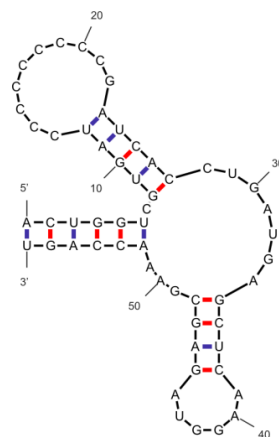
Ara1 WT



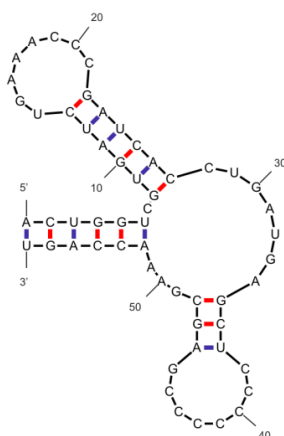
Ara1 G17



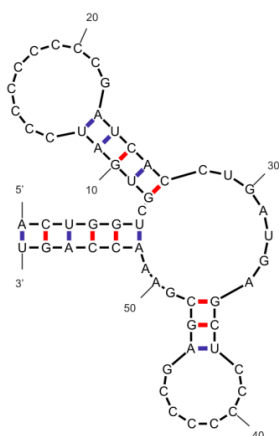
Ara1 L1pC



Ara1 L2pC



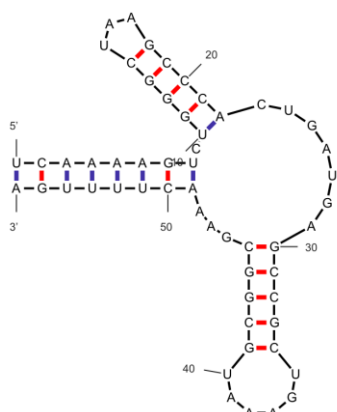
Ara1 L1L2pC

**Abb. A7.3: Strukturen der generierten Mutanten basierend auf der Ara1 WT Sequenz**

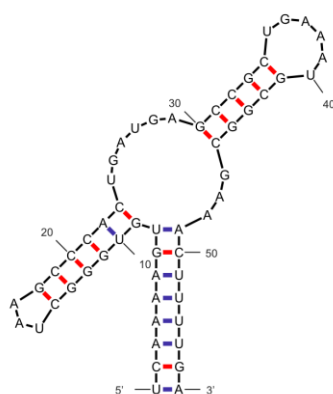
Ara1 G17 Mutante mit einem G an Position 17 in der Core-Region anstatt einem C (oben Mitte). Ara1 L1pC Mutante, gesamte Loop1 durch C ersetzt (oben rechts). Ara1 L2pC Mutante, gesamte Loop2 durch C ersetzt (unten links). Ara1 L1L2pC Mutante, Loop1 und 2 durch C ersetzt (unten Mitte).

PLMVd Motive

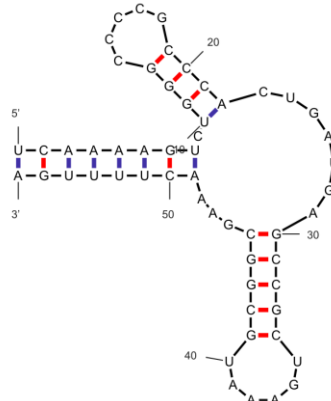
PLMVd WT



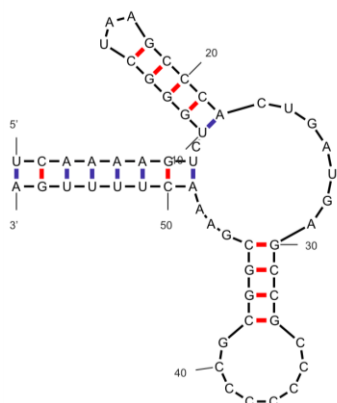
PLMVd G17



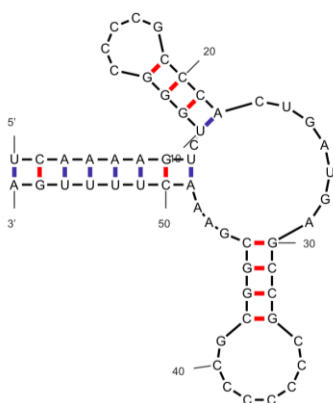
PLMVd L1pC



PLMVd L2pC



PLMVd L1L2pC

**Abb. A7.3: Strukturen der generierten Mutanten basierend auf der PLMVd WT Sequenz**

PLMVd G17 Mutante mit einem G an Position 17 in der Core-Region anstatt einem C (oben Mitte). PLMVd L1pC Mutante, gesamte Loop1 durch C ersetzt (oben rechts). PLMVd L2pC Mutante, gesamte Loop2 durch C ersetzt (unten links). PLMVd L1L2pC Mutante, Loop1 und 2 durch C ersetzt (unten Mitte).

A8 Primer Extension Assay der G17 Mutante im Vergleich zum WT

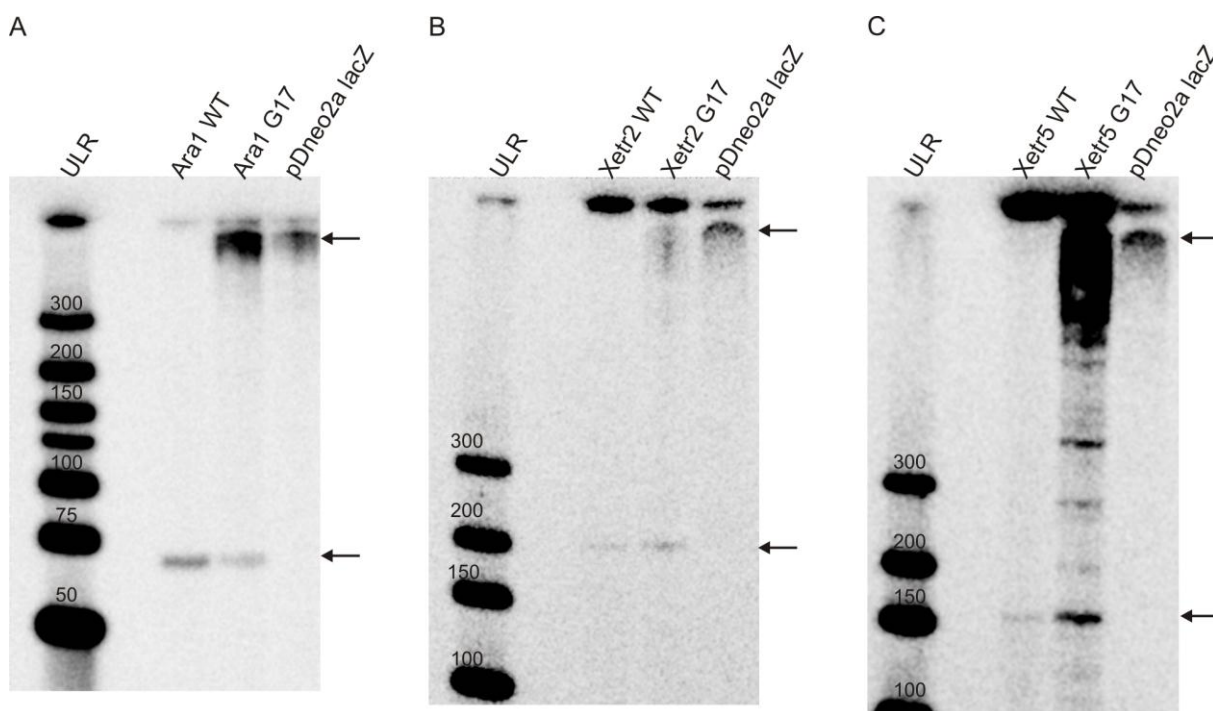


Abb. A8: Primer Extension Assay der G17 Mutante im Vergleich zum WT

Gesamt-RNA der verschiedenen Expressionsstämme wurde isoliert und mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid inkubiert, welches zwischen dem PolyA-Signal und dem HHRz bindet. Durch reverse Transkriptase wurde das Oligonukleotid am 3'-Ende verlängert und führte zu einem frühzeitigen Abbruch der Transkription an der Spaltstelle der HHRz. Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem 10%igem PAA-Gel und wurde nach einer Exposition von 48h mittels einem PhosphorImagers visualisiert. **A** Primer Extension Assay der Ara1, **B** der Xetr2 und **C** der Xetr5 G17 Mutante im Vergleich zum WT HHRz Konstrukt. Als Größenstandart wurde der zuvor radioaktiv markierte Marker: GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (ULR) der Firma Fermentas verwendet. Die Pfeile markieren die erwarteten Transkripte, wobei im WT nur die gespaltene β -Gal mRNA (unterer Pfeil), in den G17 Mutanten gespaltene und ungespaltene mRNA und im Kontrollstamm nur die ungespaltene mRNA (oberer Pfeil) nachgewiesen werden konnten.

Danksagung

Dr. Christian Hammann möchte ich für die Überlassung des vielfältigen und interessanten Themas, die stets kompetente und freundliche Betreuung und die Ruhe die er einem in kritischen Situationen gibt, recht herzlich danken.

Frau Prof. Dr. Pfeifer danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ein großes Dankeschön geht an die gesamte Arbeitsgruppe *Ribogenetics* für das freundliche und hilfsbereite Arbeitsklima. Carsten Seehafer möchte ich für die gute Zusammenarbeit auf dem Feld der Ribozyme danken und für die geduldige Bereitschaft mir die Bioinformatik nahezubringen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine *Bench*-Nachbarin Janis Kruse, die nicht nur meine schlechte Laune und meine Zeiten der überstrapazierten Nerven erduldet und überstanden hat, sondern mir Ihrer konstruktiven Kritik, Ihren Ideen und Ihrer unerschöpflichen guten Laune immer wieder den nötigen Anstoß zum Gelingen dieser Arbeit gegeben hat. Des Weiteren möchte ich mich für die Freundschaft, die zahlreichen netten Abende (nicht nur auf dem Weihnachtsmarkt) und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Wir sind und bleiben ein unschlagbares Team – AK & JK.

Von ganzen Herzen möchte ich mich bei Anja, meinen beiden Brüdern, Enrico und Riccardo und meinen Neffen Julius, Gustav und Friedrich bedanken, die mich stets bestärkt haben wenn ich an mir gezweifelt habe und für die nötige Abwechslung gesorgt haben.

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meiner Mama bedanken. Du hast in all der Zeit immer zu mir gestanden, mich aufgebaut und tatkräftig unterstützt. Ohne dich wäre das alles nie möglich gewesen! ICH VERMISSE DICH!!!

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Anne Kalweit
Geburtsdatum	10.06.1982
Geburtsort	Mittweida
Nationalität	deutsch
Kontakt	anne@kalweit-frankenber.de

Schulbildung

06.2001	Allgemeine Hochschulreife Martin-Luther-Gymnasium, Frankenberg (Sachsen)
----------------	---

Studium

2001-2008	Studium Diplom Biologie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale Diplomarbeit am Institut für Pflanzenphysiologie, Abt. Entwicklungsbiologie in der AG Prof. Dr. K. Humbeck Thema: „Lektin-Rezeptorkinasen aus <i>Hordeum vulgare</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i> : Mögliche regulatorische Faktoren der Blattseneszenz“
19.02.2008	Abschluss Diplombiologin

Promotion

04.2009-03.2010	Doktorandin Universität Kassel, Abt. Genetik, AG Dr. C. Hammann
03.2010-08.2012	Doktorandin TU-Darmstadt, Institut für Mikrobiologie und Genetik, AG Ribogenetics, Dr. C. Hammann
seit 08.2012	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Jacobs University Bremen, Abt. Ribogenetics@Biochemistry Laboratory, AG Dr. C. Hammann